

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
MARILYN PLOUFFE**

**ÉTUDE DU POTENTIEL ANTI-INFLAMMATOIRE DE LA QUERCÉTINE ET DE LA
SÉSAMINE SUR LES CELLULES MICROGLIALES N9 ACTIVÉES PAR TROIS
NEUROTOXINES : LE LIPOPOLYSACCHARIDE,
LE MÉTHYL-1-PHÉNYL-4-PYRIDINIUM ET LE PARAQUAT**

JANVIER 2010

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

AVANT-PROPOS

Les sciences me passionnent depuis longtemps : le milieu hospitalier m'y initia. L'énergie avec laquelle tous ces gens combattent la maladie et la souffrance humaine a réveillé en moi le désir d'aider autrui. Toutefois, j'ai vite compris que je n'avais pas envie de mettre en application les résultats de la science, mais plutôt d'aller de l'avant, d'être au cœur de la recherche! C'est ainsi que je me suis inscrite au programme de Biologie Médicale donné par l'UQTR. Le laboratoire de neurobiologie cellulaire du Dre Maria-Grazia Martinoli m'a accueilli la première fois en tant que stagiaire de fin de baccalauréat. Je fus donc initiée au monde de la recherche fondamentale. Un monde où les échecs ne se comptent plus, mais où la réussite vous remplit d'une extase : la valorisation d'apporter son morceau au casse-tête de la connaissance!

Ainsi, j'entrai dans le mystérieux monde des neurosciences. La complexité du fonctionnement du cerveau est tellement grande qu'il est difficile de ne pas s'y intéresser! J'ai eu le privilège d'apporter ma contribution à la connaissance de la maladie de Parkinson, une terrible maladie dont l'étiologie demeure inconnue. Cette maladie me touche particulièrement et c'est un honneur pour moi que d'avoir pu travailler sur un projet qui cherche à trouver de nouvelles thérapies complémentaires et préventives.

Je voudrais d'abord remercier ma directrice de recherche, Maria-Grazia Martinoli pour la confiance et la liberté accordées dans mon projet. Elle a su me diriger et me guider dans ce projet qui a changé de ligne directrice tellement de fois! Merci à Fanny Longpré, avec qui les longues discussions sur les impasses aboutissaient toujours à une solution! Merci à Marie-Eve Laramée et à Julie Carange : avec elles, la vie de maîtrise fut un charme! Merci à mes autres collègues de laboratoire, pour votre soutien et votre aide : Vicky Lahaie-Collin, Julie Bournival, Cindy Provencher, Judith Nguemjio, Joshua Cloutier-Beaupré, Patrik Quessy et Cindy Tremblay. Merci à mon chum, Marc-Antoine Pelletier, de m'avoir calmé et soutenu tout au long de ces deux années! Merci à ma famille d'être là et d'avoir confiance en moi. Maman, ceci est pour toi.

RÉSUMÉ

Le cerveau a longtemps été considéré comme un organe immunoprivilégié. Ce temps est révolu, et il est reconnu aujourd'hui qu'il comporte un système de défense privilégié avec la barrière hématoencéphalique et la cellule microgliale. Celle-ci est la principale responsable de la neuroinflammation. De type aigu, cette inflammation sera bénéfique. Par contre, de manière chronique, elle sera néfaste pour l'hôte. En effet, la microglie peut produire et sécréter une panoplie de facteurs inflammatoires tels les cytokines et plusieurs radicaux libres. Ces facteurs provoquent un état de stress oxydant chez les cellules environnantes. Les phénomènes de neuroinflammation et de stress oxydant représentent des causes suspectées d'être impliquées dans la maladie de Parkinson. Le but de mon projet était d'abord de déterminer et de comparer le potentiel inflammatoire du 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP+), du paraquat (PQ) et du lipopolysaccharide (LPS), afin d'établir un bon modèle d'étude de la neuroinflammation. En second lieu, j'ai évalué le potentiel anti-inflammatoire de deux molécules naturelles, la quercétine et la sésamine, déjà reconnues pour leurs bonnes capacités protectrices. Finalement, ces molécules ont été évaluées dans une coculture microgliale N9 – neuronale PC12 pour vérifier leur capacité à diminuer la mortalité neuronale inflammatoire. Le potentiel neuroinflammatoire des trois toxines au niveau des microglies N9 a été évalué selon deux paramètres : la transcription de la cytokine IL-6 par RT-qPCR et l'expression de l'enzyme iNOS par immunobuvardage de type « Western ». Ensuite, l'effet de la quercétine et de la sésamine, en prétraitement, a été déterminé sur ces mêmes paramètres. Les résultats ont démontré par chacune des trois toxines, chez la cellule N9, une augmentation dans la transcription d'IL-6 et celle-ci

était diminuée grâce aux deux molécules naturelles. Pour ce qui est d'iNOS, son expression était augmentée par le LPS et le PQ. Cette hausse a pu être diminuée par les deux molécules d'intérêt. Le prétraitement a diminué la mortalité neuronale induite par l'activation microgliale, confirmée par le dosage de la cytokine IL-6. De plus, un marquage positif au TUNEL nous suggère une mortalité apoptotique. Ces résultats me permettent de conclure que les trois toxines induisent une activation microgliale, laquelle est diminuée par un prétraitement avec la quercétine et la sésamine. Ces molécules possèdent donc de bonnes capacités anti-inflammatoires. Ainsi, elles sont prometteuses comme molécules « santé » facilement intégrables à l'alimentation quotidienne et pourraient constituer une intéressante approche préventive aux maladies neurodégénératives telle que la MP.

Mots clés : Neuroinflammation, Neuroprotection, Parkinson, Quercétine, Sésamine, Cytokine, IL-6, iNOS, RT-qPCR, Coculture.

TABLES DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ÉQUATIONS	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
CHAPITRE 1	
INTRODUCTION.....	1
1.1 La neuroinflammation.....	1
1.1.1 Le système immunitaire du cerveau.....	2
1.1.2 La neuroimmunité et la BHE	4
1.1.3 La neuroimmunité et les cellules gliales	5
1.1.4 Facteurs médiateurs de la neuroinflammation	17
1.1.4.1 Les cytokines	19
1.1.4.2 Les Substances Oxygénées Réactives (ROS) et les PG.....	22
1.1.5 La cellule microgliale : Amie ou Ennemie?.....	24
1.2 La MP	25
1.2.1 Épidémiologie de la MP.....	26
1.2.2 Sémiologie de la MP	27
1.2.2.1 Symptômes moteurs de la MP	28
1.2.2.2 Symptômes non-moteurs de la MP	29
1.2.2.3 Le diagnostic de la MP	31
1.2.2.4 Évolution clinique de la MP	32
1.2.3 Physio-anatomopathologie de la MP	33
1.2.3.1 Anatomie du contrôle moteur	33
1.2.3.2 Déplétion des neurones DAergiques dans la MP	36
1.2.3.3 Présence de CL dans la MP	37
1.3 L'étiologie de la MP.....	38

1.3.1	La MP héréditaire.....	39
1.3.2	Les facteurs toxiques et la MP	42
1.3.3	Le stress oxydant et la MP	43
1.3.4	La neuroinflammation et la MP	44
1.3.4.1	Les modèles pour l'étude de la neuroinflammation dans la MP	46
1.4	Les traitements de la MP	52
1.4.1	Traitements médicamenteux de la MP	52
1.4.1.1	La dopathérapie	52
1.4.1.2	Les agonistes DAergiques	54
1.4.1.3	Les anticholinergiques	55
1.4.2	Traitements chirurgicaux de la MP	55
1.4.2.1	La pallidectomie et la thalamotomie.....	55
1.4.2.2	La SCP	56
1.4.2.3	Greffe neuronale	58
1.4.3	Les thérapies préventives de la MP	58
1.5	La Quercétine	59
1.5.1	La biodisponibilité de la quercétine	59
1.5.2	La quercétine en tant qu'anti-cancer	60
1.5.3	L'activité antihistaminique de la quercétine	61
1.5.4	La quercétine comme antioxydante	61
1.5.5	La quercétine comme anti-inflammatoire	62
1.6	La Sésamine	62
1.6.1.	La biodisponibilité de la sésamine	63
1.6.2.	La sésamine comme anti-hypertensive	64
1.6.3.	L'activité hypocholestérolémique de la sésamine.....	65
1.6.4.	La sésamine comme antioxydante	65
1.6.5	La sésamine comme anti-inflammatoire	66
1.7	Mes objectifs de recherche.....	66

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES 68

2.1	Matériaux utilisés.....	68
-----	-------------------------	----

2.2	Cultures cellulaires.....	68
2.3	Traitements cellulaires	70
2.4	Mesure de la mortalité cellulaire.....	72
2.5	RétroTranscription - Réaction en chaine par polymérase quantitative	
	(RT-qPCR).....	74
2.6	Immunobuvardage de type «Western»	75
2.7	«Enzyme Linked ImmunobSorbent Assay» (ELISA)	76
2.8	Détection de la fragmentation d'ADN par la technique TUNEL	77
2.9	Analyse statistique	77

CHAPITRE 3

RÉSULTATS..... 78

3.1	Dose-réponse du MPP+ pour l'induction d'une activation microgliale	78
3.1.1	La mortalité microgliale en fonction de la concentration de MPP+	78
3.1.2	La transcription de la cytokine IL-6 en fonction de la concentration	
	de MPP+.....	79
3.2	Dose-réponse du PQ pour l'induction d'une activation microgliale.....	79
3.2.1	La mortalité microgliale N9 en fonction de la concentration de PQ.....	80
3.2.2	La transcription de la cytokine IL-6 en fonction de la concentration	
	de PQ.....	80
3.3	Cinétique dans le temps : Transcription de la cytokine IL-6 dans.....	
	le temps selon la toxine.....	81
3.4	Cinétique dans le temps : Expression de la protéine iNOS dans le temps.....	
	selon la toxine	83
3.5	Transcription de la cytokine IL-6 en fonction du traitement avec la	
	quercétine et la sésamine.....	84
3.6	Expression de la protéine iNOS en fonction du traitement avec la.....	
	quercétine et la sésamine.....	85
3.7	Détermination de la mortalité neuronale induite par les cellules	
	microgliales en fonction du traitement dans un modèle de coculture	
	microgliale N9 - neuronale PC12.....	87
3.8	Expression de la cytokine IL-6 en fonction du traitement avec la	

quercétine et la sésamine dans un modèle de coculture microgliale N9 –	
neuronale PC12	88
3.9 Mortalité neuronale induite par les microglies en fonction du traitement	
avec la quercétine et la sésamine dans un modèle de coculture.....	
microgliale N9 – neuronale PC12.....	89
3.10 Mortalité apoptotique neuronale induite par les microglies en fonction.....	
du traitement avec la quercétine et la sésamine dans un modèle de	
coculture microgliale N9 – neuronale PC12	91
CHAPITRE 4	
DISCUSSION	93
CHAPITRE 5	
CONCLUSIONS	98
RÉFÉRENCES.....	100

LISTE DES FIGURES

1.1	Le nombre de publications concernant la neuroinflammation retrouvée sur http://www.pubmed.com en fonction de l'année.....	2
1.2	La BHE et ses composantes [14]	4
1.3	Les cellules du SNC [14].....	6
1.4	Les caractéristiques différenciant les traumatismes cérébraux des maladies neurodégénératives [24].....	7
1.5	Séquence des événements cellulaires dans le SNC suite à l'injection d'une neurotoxine, le MPTP [22].....	8
1.6	Préservation de la quiescence microgliale sous conditions physiologiques normales du SNC [46].....	13
1.7	Bris de l'environnement inhibiteur de l'activation microgliale [46].....	14
1.8	Les récepteurs qui enclenchent ou amplifient une réponse microgliale [58].....	16
1.9	Morphologie de la microglie. De la gauche vers la droite : transformation de la microglie au repos vers la microglie activée [84].....	17
1.10	Facteurs médiateurs de la neuroinflammation produits par les cellules microgliales [107].....	18
1.11	Différents ROS impliqués dans le SNC [134].....	23
1.12	Posture caractéristique de la MP [168].....	29
1.13	Évolution de la MP.....	33
1.14	(A) Niveau de la coupe de la figure B (B) Anatomie des ganglions de la base.....	34
1.15	Les circuits neuronaux impliqués dans le contrôle moteur [183].....	35
1.16	Les systèmes DAergiques, incluant la voie nigrostriée.....	36
1.17	Caractéristiques neuropathologiques de la MP [165].....	37
1.18	Pigmentation neuromélanique du cerveau normal (haut) et du cerveau parkinsonien (bas) [187].....	37

1.19	Corps de Lewy [165].....	38
1.20	Étiologie de la MP.....	39
1.21	Le stress oxydant : un état de déséquilibre [209].....	43
1.22	Le rôle de la neuroinflammation dans la MP [214].....	44
1.23	Structure du MPP+ [165].....	46
1.24	Les mécanismes d'action du MPTP/MPP+ [226].....	47
1.25	Le PQ comme herbicide.....	48
1.26	Structures du MPP+ et du PQ [165].....	49
1.27	Structure du LPS.....	51
1.28	Signalisation intracellulaire induite par le LPS [1].....	51
1.29	Synthèse des catécholamines.....	53
1.30	(A) Un patient subissant la SCP (B) Schéma illustrant la SCP.....	57
1.31	Choix des cibles chirurgicales selon les symptômes [167].....	57
1.32	Structure de la quercétine.....	59
1.33	Aliments contenant une grande quantité de quercétine.....	60
1.34	Plante de sésame.....	63
1.35	Graine de sésame.....	63
1.36	Structure de la sésamine.....	64
2.1	Les cellules microgliales N9 en immunofluorescence Rouge = Cy3 pour la β -actine, Bleu = DAPI pour les noyaux.....	69
2.2	Cellules neuronales PC12 (A) Natives, non-différenciées (B) Différenciées, suite à l'ajout de NGF.....	69
2.3	Exemples d'inserts utilisés en coculture.....	70

2.4	Schéma démontrant l'organisation de la coculture Microgliale N9 – Neuronale PC12.....	70
2.5	Prétraitements avec les molécules naturelles et traitement avec les toxines MPP+, paraquat et LPS au niveau des cellules microgliales N9.....	71
2.6	Traitement pour la coculture microgliale N9 – Neuronale PC12.....	72
2.7	Réaction colorimétrique du dosage de l'activité de la LDH.....	73
3.1	La mortalité microgliale N9 selon une dose-réponse du MPP+, N=1.....	78
3.2	Niveau de transcription de la cytokine IL-6 chez les cellules microgliales N9 selon une dose-réponse du MPP+, N=1.....	79
3.3	Mortalité chez les cellules microgliales N9 selon une dose-réponse du PQ, N=1.....	80
3.4	La transcription de la cytokine IL-6 chez les cellules microgliales N9 selon la dose-réponse du PQ, N=1.....	81
3.5	(A) Cinétique dans le temps de l'effet du MPP+, du PQ et du LPS sur le niveau de transcription de la cytokine IL-6 chez les cellules microgliales N9, ***p < 0,001, **p<0,01 et *p<0,05 vs Contrôle, N=3 (B) Agrandissement du temps 12 h	82
3.6	Cinétique dans le temps de l'effet du MPP+, du PQ et du LPS sur le niveau d'expression de l'enzyme iNOS chez les cellules microgliales N9, ***p<0,001 et **p<0,01 vs Contrôle, N=3.....	84
3.7	Effet de la quercétine et de la sésamine sur le niveau de transcription de la cytokine IL-6 chez les cellules microgliales N9 activées par le MPP+, le PQ et le LPS, ***p < 0,001 vs Contrôle, °°p<0,01 et °p<0,05 vs MPP+, ▲p<0,05 vs LPS, N=3.....	85
3.8	Effet de la quercétine et de la sésamine sur l'expression d'iNOS des cellules microgliales N9 activées par le PQ et le LPS, ***p < 0,001 vs Contrôle, #p<0,05 vs PQ, ▲▲▲p<0,001 vs LPS, N=3.....	87
3.9	Effet du MPP+, du PQ et du LPS sur la mort neuronale dans un modèle de coculture microgliale N9 - neuronale PC12, en présence ou non des cellules microgliales, N=1.....	88

3.10	Effet de la quercétine et de la sésamine sur l'expression d'IL-6 dans un modèle de coculture microgliale N9 - neuronale PC12, ***p<0,001, **p< 0,01 vs Contrôle, °p<0,05 vs MPP+, #p<0,05 vs PQ, ▲▲p<0,01 vs LPS, N=4.....	89
3.11	Effet de la quercétine et de la sésamine sur la mort neuronale dans un modèle de coculture microgliale N9 - neuronale PC12, ***p<0,001, **p< 0,01 et Contrôle, °°p<0,01 vs MPP+, ##p<0,01 et #p<0,05 vs PQ, ▲▲p<0,001 vs LPS, N=3.....	90
3.12	Marquage au DAPI (noyaux totaux = Bleu) et au TUNEL (noyaux en fragmentation = vert) des cellules C12.....	92
3.13	Effet de la quercétine et de la sésamine sur le marquage au TUNEL dans un modèle de coculture microgliale N9 - neuronale PC12, ***p<0,001 et **p<0,01 vs Contrôle, °°p<0,01 vs MPP+, #p<0.05 vs PQ, N=3.....	92

LISTE DES ÉQUATIONS

- 2.1 Formule pour évaluer le pourcentage de mort cellulaire..... 74
- 2.2 Équation pour calculer l'efficacité d'une réaction, où E correspond à l'efficacité et la « pente » correspond à la pente de la droite générée par le graphique préalablement réalisé..... 75

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	ADN complémentaire
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
BDNF	« Brain derived neurotrophic factor »
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CD40L	Ligand du CD40
CL	Corps de Lewy
COX	Cyclo-oxygénase
CSF	« Colony stimulating factor »
CR	Récepteur du complément
Ct	« Cycle Threshold »
DA	Dopamine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAT	Transporteur de la dopamine
DDC	Dopa-décarboxylase
DMEM-F12	Dulbecco's modified Eagle's medium-F12
ELISA	Enzyme Linked ImmunobSorbent Assay
FBS	Sérum bovin foetal
GP	Globus pallidus
GPl	Globus pallidus latéral
GPm	Globus pallidus médian
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HS	Sérum de cheval
IDDC	Inhibiteur de la dopa-décarboxylase
IFN	Interféron
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IL	Interleukine
LDH	Lactate déshydrogénase
L-dopa	Lévodopa

LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphotoxine
MA	Maladie d'Alzheimer
MAO	Monoamine oxydase
MP	Maladie de Parkinson
MPP ⁺	1-méthyl-4-phenylpyridinium
MPTP	Méthyl-4-phényl-1-2-3-6-tétrahydropyridine
NGF	Facteur de croissance neuronal
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
NOX	NADPH oxidase
NST	Noyau subthalamique
O ₂ •	Anion superoxide
OH [•]	Radical hydroxyle
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PBS	« Phosphate buffered saline »
PG	Prostaglandine
PRR	« Pattern recognition receptors »
PQ	Paraquat
RL	Radical libre
ROS	« Reactive oxygenated substance »
RT-qPCR	RétroTranscription - Réaction en chaîne par polymérase quantitative
SCP	Stimulation cérébrale profonde
SN	Substance noire
SNC	Système nerveux central
SNpc	Substance noire pars compacta
SP	Sclérose en plaque
TEAC	« Trolox equivalent antioxidant capacity »
TLR	« Toll-like receptor »
TNF	« Tumor necrosis factor »

TNFR	Récepteur du « Tumor necrosis factor »
TP	Température pièce
UCH-L1	Ubiquitine-C terminale hydroxylase L1
VIT	Noyau ventral intermédiaire du thalamus

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La neuroinflammation

L'inflammation représente une réaction normale de l'organisme en réponse à un agent pathogène ou un trauma. Une série complexe de réactions immunologiques sont alors initiées afin de neutraliser l'invasion de l'agent pathogène, réparer les tissus endommagés et promouvoir la guérison. Ce processus est habituellement bénéfique. Toutefois, l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation ou encore par anomalies des régulations du processus inflammatoire. Il s'agit d'un processus faillible qui est souvent comparé au couteau à double tranchant. En effet, l'inflammation peut être classée comme aiguë ou chronique. Le type aigu correspond à une réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée et d'installation brutale. Ces inflammations guérissent spontanément. À l'opposé, l'inflammation chronique n'a aucune tendance à la guérison spontanée et persiste en s'aggravant pendant plusieurs mois voire plusieurs années. Ces inflammations résultent de la présence persistante de l'agent pathogène ou de la sévérité du trauma.

Les pathologies humaines impliquant une forme ou une autre d'inflammation sont innombrables. On a qu'à penser aux maladies inflammatoires chroniques intestinales plus connues sous l'acronyme MICI, à l'asthme, une maladie inflammatoire des bronches ou encore au cancer, dont 1 cas sur 6 proviendrait de conditions inflammatoires chroniques [2]. Mais qu'en est-il des maladies neurologiques? Est-ce que l'inflammation affecte aussi le cerveau?

En fait, le cerveau a longtemps été considéré comme un organe immunologiquement quiescent, et donc immunoprivilégié. Pourtant, tout au long de la dernière décennie, de nombreuses évidences ont démontré un important rôle pour l'inflammation dans la pathophysiologie de plusieurs maladies neurologiques tel que la

sclérose en plaques (SP) [3], la maladie d'Alzheimer (MA) [4] et la maladie de Parkinson (MP) [5]. En effet, la neuroinflammation, de la même manière que l'inflammation au niveau du reste du corps humain, est généralement bénéfique et permet au cerveau de répondre aux changements dans son environnement ainsi que de disposer des substances indésirables et des tissus endommagés. Toutefois, ce processus bénéfique perd parfois le contrôle et les processus neuroinflammatoires persistent, même après l'élimination du stimulus initial. Une question demeure : cette neuroinflammation provoque-t-elle la maladie, ou en est-elle simplement une conséquence? Une chose est certaine, cette inflammation qui sévit au sein du cerveau est totalement différente de ce qui se passe dans le reste du corps humain et beaucoup d'aspects restent à élucider [6]. En fait, la neuroinflammation est un concept plutôt récent dans la littérature (voir figure 1.1). Cette notion de neuroinflammation est de plus en plus étudiée à travers le monde et elle commence tranquillement à nous dévoiler les mystères de ses mécanismes d'actions.

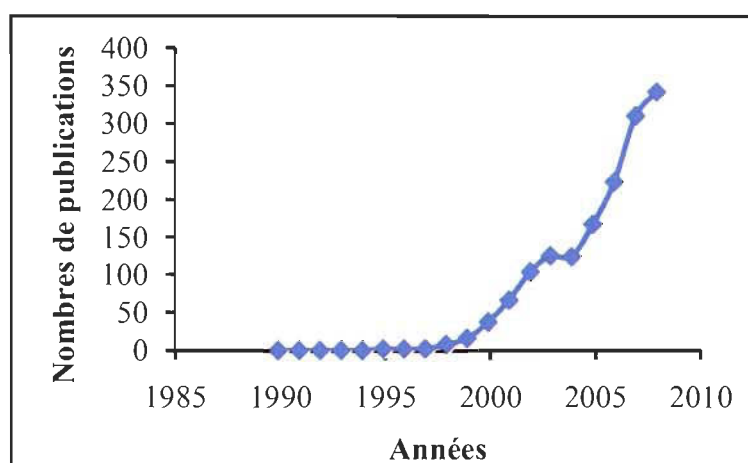


FIGURE 1.1 Le nombre de publications concernant la neuroinflammation retrouvée sur <http://www.pubmed.com> en fonction de l'année

1.1.1 Le système immunitaire du cerveau

Même si la neuroinflammation demeure un concept relativement récent, les scientifiques se posent des questions depuis le début du dernier siècle au sujet de cet organe, le cerveau, qui semblait être privé de surveillance immunitaire. En effet, en 1921, Shirai et son équipe ont démontré qu'un sarcome de rat transplanté au niveau du parenchyme cérébral d'une souris se développait bien, contrairement aux sarcomes qui

étaient transplantés au niveau intramusculaire [7]. Cette étude marquait le début du concept selon lequel le système nerveux central (SNC) est immunologiquement « privilégié ». Par la suite, ces observations ont été confirmées à maintes reprises avec des coupes de tissu [8], des bactéries [9] et des virus [10].

Ce caractère d'immunoprivilège lui permet ainsi de limiter les dommages inflammatoires au sein d'un organe si fragile et au vu de sa capacité de régénération [11]. Toutefois, ce concept d'immunoprivilège a été redéfini et ne relate plus l'absence absolue d'un système neuroimmunitaire actif, mais plutôt sa stricte régulation [11].

En fait, il est maintenant bien connu que le cerveau possède son propre système de surveillance immunitaire. Celui-ci est différent du reste du corps humain selon plusieurs caractéristiques. D'une part, au contraire des autres tissus, le cerveau est séparé de la circulation sanguine par la barrière hématoencéphalique (BHE). Celle-ci sera décrite de façon plus détaillée à la section 1.1.2. D'autre part, le SNC n'est pas drainé par un réseau de vaisseaux lymphatiques bien organisé, tel que dans les autres tissus et organes. Ensuite, une autre particularité du système immunitaire du SNC est la quasi-absence de molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ce complexe correspond à une information génétique exprimée sous forme de protéine de surface, importante pour la reconnaissance cellulaire et pour le développement d'une réponse immunitaire. En fait, le CMH de classe I s'exprime de façon quasi ubiquitaire sur les cellules nucléées du corps humain, tandis que le CMH de classe II est exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène tels les cellules dendritiques, les lymphocytes B activés, les macrophages et les cellules microgliales activées. Par contre, ni les molécules du CMH de classe I, ni les molécules du CMH de classe II, ne se retrouvent dans le SNC sain [12]. Finalement, la dernière distinction du SNC consiste en sa surveillance et sa régulation par les cellules gliales. Cet aspect sera présenté en détail à la section 1.1.3.

Le cerveau présente donc une défense immunitaire bien spéciale principalement régie par la BHE et les cellules gliales. Bien que beaucoup de progrès aient été faits, la

compréhension des processus entourant l'induction et la maintenance de cette défense neuroimmunitaire est loin d'être à point [11].

1.1.2 La neuroimmunité et la BHE

L'élément principal de la surveillance immune du SNC est sans aucun doute la BHE. Cette barrière physiologique complexe est conçue afin de contrôler l'homéostasie cérébrale et de protéger le SNC des agents pathogènes circulants. Elle est composée de la membrane basale des capillaires sanguins, des cellules endothéliales cérébrales, du réseau de pieds d'astrocytes et des péricytes (voir figure 1.2) [13].

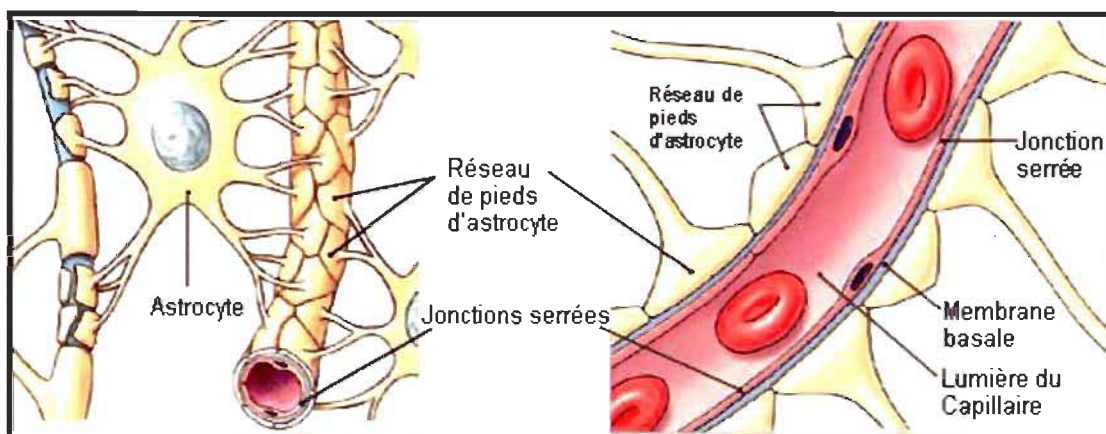


FIGURE 1.2 La BHE et ses composantes [14]

Chacune de ces composantes joue un rôle bien spécifique et important. D'une part, les cellules endothéliales cérébrales présentent plusieurs caractéristiques qui les différencient des autres cellules endothéliales. En effet, elles possèdent une faible activité de pinocytose et de diffusion paracellulaire, accentuant ainsi le transport moléculaire transcellulaire au sein de la BHE [15]. De plus, contrairement aux autres cellules endothéliales, une absence de fenestration corrèle avec la présence des jonctions serrées intercellulaires [15]. Ces jonctions sont responsables de l'imperméabilité de la barrière pour les macromolécules et les cellules nucléées. D'autre part, les astrocytes semblent indispensables à l'intégrité de la barrière puisqu'une étude a démontré leur nécessité pour la réparation de la BHE après un dommage cérébral [16].

Toutefois, comme toute structure du corps humain, la BHE n'est pas infailible. En effet, de plus en plus de conditions sont reconnues pour altérer la perméabilité de la barrière et bon nombre d'études démontrent l'implication de cette altération dans la pathophysiologie d'une grande variété de maladies neurologiques [13]. Par exemple, la SP est une maladie invalidante, de progression lente dans laquelle le système immunitaire attaque la gaine de myéline enroulant les axones des neurones du SNC. En fait, plutôt qu'être une maladie auto-immune, la sclérose en plaques est une maladie de la BHE. Les leucocytes, principales responsables de la destruction de la myéline, sont présents dans le SNC grâce à une augmentation de la perméabilité de la BHE. Toutefois, les conditions menant à l'altération de la barrière demeurent toujours inconnues [13, 17]. Par ailleurs, de nombreuses évidences démontrent maintenant l'implication de l'altération de la BHE dans la progression des maladies neurodégénératives telles que la MA et la MP [13, 18].

La BHE offre donc une perméabilité relative en situation pathologique. Ainsi, dans de telles situations, il devient important que le SNC possède un système de surveillance élaboré et strictement contrôlé.

1.1.3 Les cellules de la neuroimmunité

Heureusement, un système de surveillance existe au sein du SNC et il est principalement régi par les cellules gliales. Les cellules gliales incluent l'oligodendrocyte, la microglie et l'astrocyte (voir figure 1.3). La vision traditionnelle de ces cellules comme support aux neurones est maintenant révolue et il est aujourd'hui reconnu qu'elles sont en plus les principales défenderesses du cerveau grâce à leur immunocompétence [19].

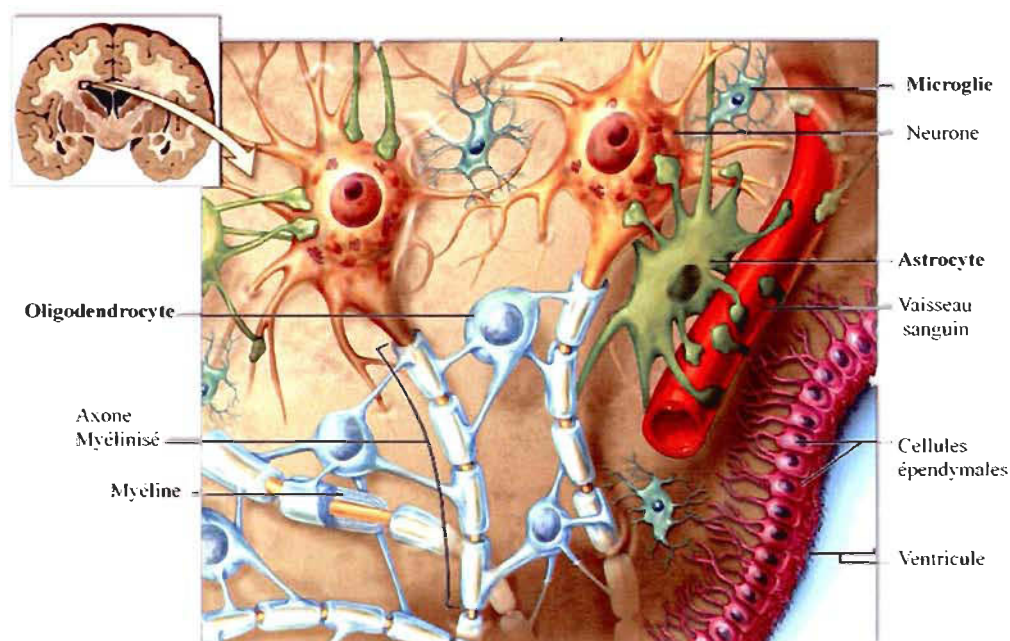


FIGURE 1.3 Les cellules du SNC [14]

Le processus dominant initié au SNC suite à une insulte est l'activation des cellules gliales, qu'on nomme aussi la « gliose réactive ». Ces cellules s'activent rapidement en changeant leur conformation. Il y a alors une modulation au niveau de l'expression des récepteurs cellulaires ainsi qu'une production d'une panoplie de facteurs médiateurs de l'inflammation. Ainsi, l'immunité cérébrale sera modulée par les oligodendrocytes et les astrocytes, mais surtout par les cellules microgliales.

En situation normale, le ne présente peu ou pas d'infiltration leucocytaire [20]. Mais en situation pathologique, la BHE devient perméable et permet le passage des cellules immunitaires périphériques [20-24]. Plusieurs études ont démontré l'implication des cellules T, des macrophages et des cellules dendritiques au niveau de la modulation de l'inflammation retrouvée au sein des maladies neurodégénératives [23]. D'autres études apportent cependant certaines précisions. En effet, il semble que lorsque le dommage tissulaire est subtil (sans implication vasculaire ou sur de longues périodes de temps), l'induction neuroinflammatoire sera dépourvue de recrutement leucocytaire [24]. Une activation gliale de cette sorte est retrouvée dans la MA et la MP [24]. Par contre, dans la SP, suite à un trauma ou une ischémie, il semblerait que les processus

neuroinflammatoires aigües engendrés par les cellules gliales seraient à l'origine d'une grande infiltration leucocytaire au niveau du SNC (voir figure 1.4) [24].

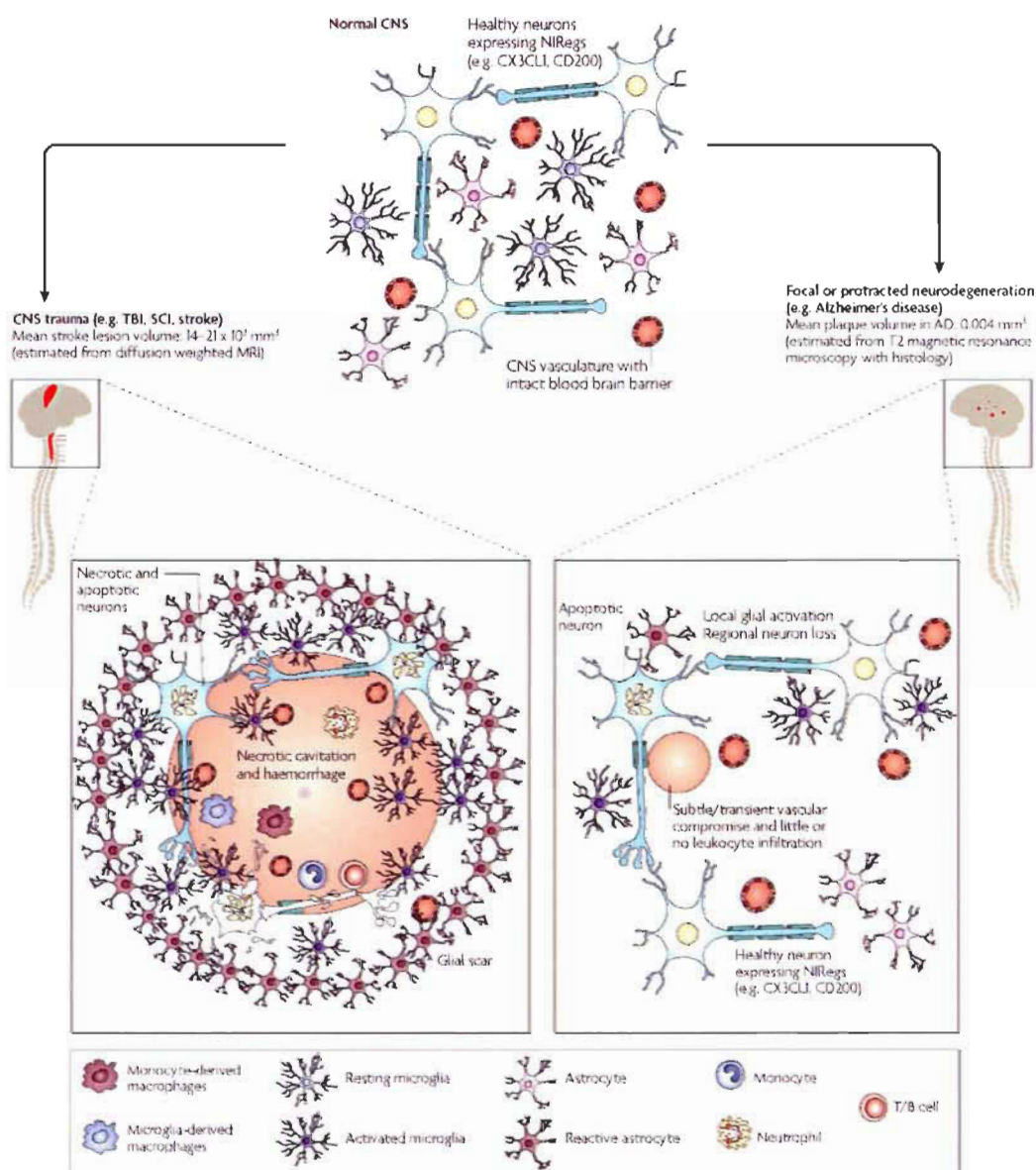


FIGURE 1.4 Les caractéristiques différenciant les traumatismes cérébraux des maladies neurodégénératives [24]

Malgré tout, plusieurs études continuent de soutenir l'hypothèse selon laquelle une augmentation des cellules T est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives [23]. Ainsi, il semblerait que les cellules microgliales pourraient jouer un rôle au niveau de l'immunité innée et acquise, par l'infiltration des cellules T. Cependant, une fois la

BHE passée, les leucocytes doivent faire face à une seconde barrière, plus hostile : la barrière microgliale [25]. En effet, un grand nombre de mécanismes ayant pour but l'apoptose des cellules T a lieu au sein du SNC, afin de se prévenir des maladies auto-immunes comme la SP [25]. Par exemple, il a été démontré que l'activation de l'apoptose des cellules T était enclenchée via la voie du récepteur CD95/Fas [26] ainsi que via l'expression du TNFRI par les cellules microgliales [27]. De plus, il a été suggéré que les ROS et le NO sécrété par la microglie activée soient responsables de cette apoptose [28]. Ainsi, les cellules T périphériques présentes dans le SNC sont strictement contrôlées et limitées.

Finalement, l'infiltration leucocytaire est subséquente à l'activation microgliale tel que démontré dans une étude utilisant le MPTP comme inducteur de mortalité neuronale (voir figure 1.5) [22]. Puisque la microglie a le potentiel de modifier la perméabilité de la BHE, et donc de moduler l'infiltration des cellules T, il apparaît évident que les réactions immunitaires au niveau du SNC sont beaucoup plus régulées et exécutées par les cellules gliales. C'est pourquoi les cellules T ne seront pas prises en considération dans ce mémoire.

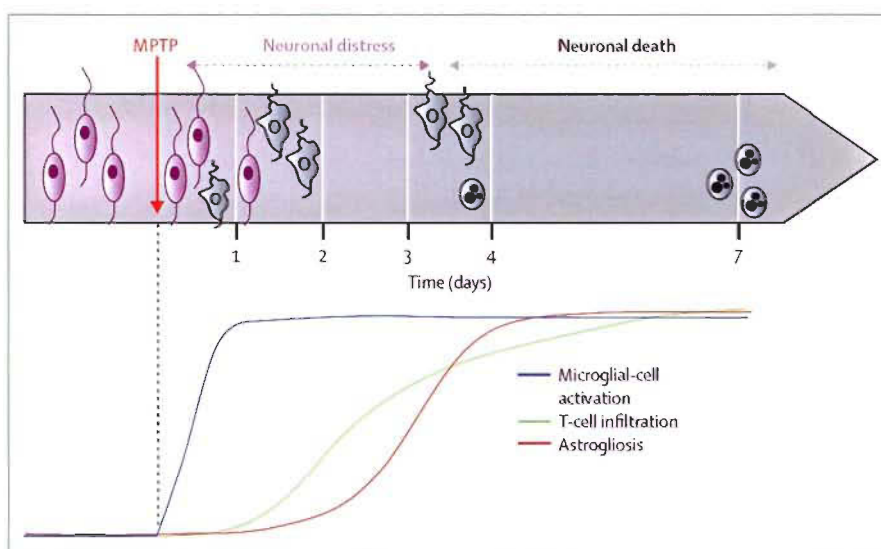


FIGURE 1.5 Séquence des événements cellulaires dans le SNC suite à l'injection d'une neurotoxine, le MPTP [22]

1.1.3.1 L'astrocyte

Les astrocytes représentent le type cellulaire le plus abondant du SNC [29]. Ils sont habituellement décrits comme des cellules de maintien qui participent indirectement à la transmission nerveuse. En effet, les astrocytes possèdent bon nombre de récepteurs fonctionnels pour les neurotransmetteurs. Une étude a démontré que ces cellules contrôlent le niveau d'ions et de neurotransmetteurs au niveau extracellulaire. Les neurones en culture possèdent une faible activité synaptique en l'absence d'astrocyte [30].

Par ailleurs, les astrocytes sont reconnus pour participer activement à la réponse neuroinflammatoire [31]. En effet, ces cellules migrent au site de dommage neuronal et s'activent en prenant une morphologie hypertrophique. Toutefois, ces astrocytes réactifs ne semblent pas attaquer l'agent pathogène ou encore promouvoir la guérison comme le ferait la cellule microgliale. Les astrocytes entourent le site en guise de protection. Cette fonction demeure toutefois très nébuleuse [31]. Il a été démontré que ces cellules sont aussi en mesure de produire et de sécréter un grand nombre de facteurs médiateurs de l'inflammation telle que plusieurs cytokines, chémokines et facteurs neurotrophiques [29].

Ensuite, la densité des astrocytes est beaucoup plus faible dans les régions cérébrales plus fragiles telles que la SN, contrairement aux régions contenant des neurones plus résistants [32]. Cette caractéristique suggère le potentiel neuroprotecteur de ces cellules. D'ailleurs, à l'appui de cette hypothèse, bon nombre d'auteurs ont démontré que les cellules astrogliales pouvaient produire et sécréter des facteurs neurotrophiques ayant des propriétés protectrices pour les neurones environnants. Par exemple, le « glial cell line-derived neurotrophic factor » et le « brain derived neurotrophic factor » (BDNF) ont protégé efficacement les neurones DAergiques contre la mort provoquée dans les modèles expérimentaux de la MP [33, 34].

Finalement, il est important de rappeler que les astrocytes jouent un rôle primordial dans l'intégrité de la BHE tel qu'il a été mentionné dans la section 1.1.2 [13].

1.1.3.2 L'oligodendrocyte

Les oligodendrocytes sont des cellules gliales ayant pour fonction la formation de la gaine de myéline des axones des neurones du SNC. La principale conséquence de la mort des oligodendrocytes consiste en la démyélination des neurones. Subséquemment, il y a un délai ou un blocage dans le potentiel de conductance des axones [35]. Cet état pathologique est retrouvé dans la SP [17].

En plus de fournir une myélination ainsi qu'un support trophique aux neurones, les oligodendrocytes sont des participants actifs au niveau des structures et des propriétés électriques des axones par un contrôle de leur diamètre. Il semblerait que l'astrocyte viendrait en aide à l'oligodendrocyte pour toutes ces fonctions [19]. De plus, il a été démontré récemment que les oligodendrocytes pouvaient eux aussi produire et sécréter un grand nombre de médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines et les chémokines, et ainsi représenter un type cellulaire immunocompétent [36]. Toutefois, les oligodendrocytes ne semblent pas jouer un rôle primordial dans les maladies dégénératives telles que la MP, et ne seront donc pas pris en considération dans ce mémoire [37].

1.1.3.3 La cellule microgliale

La microglie constitue une population cellulaire cérébrale distincte [19, 38]. En effet, on la surnomme le macrophage du cerveau, vu les nombreuses caractéristiques qu'elle partage avec ce type cellulaire et vu son potentiel immunocompétent. Elle constitue environ 10-20 % des cellules gliales totales et elle est retrouvée de façon ubiquitaire au sein du SNC adulte [39]. Même si la cellule microgliale représente aujourd'hui un sujet très populaire en neurosciences, ses fonctions et ses capacités exactes demeurent encore un grand mystère.

Historique microglial

En fait, la cellule microgliale est un sujet d'actualité scientifique depuis peu, et ce, en dépit du fait qu'elle ait obtenu le statut de cellule gliale distincte par deux neuropathologistes : Nissl et Spielmeyer, il y a plus de 100 ans [40]. Mentionnons que le premier à en donner les détails et caractéristiques précises fut le neuroanatomiste espagnol del Rio-Hortega en 1932 [41]. Par la suite, les recherches ne furent que pour débattre du sujet controversé de l'origine microgliale.

Origine microgliale

En effet, contrairement aux neurones et aux cellules macrogliales qui ont une origine commune neuroépithéliale, l'origine de la microglie semble être mésodermale. Ces cellules présentent beaucoup de similarité avec le phénotype moléculaire de surface des monocytes, lesquelles proviennent de progéniteurs myéloïdes dérivés du mésoderme embryonnaire [42]. De plus, la quasi-totalité des marqueurs des molécules de surfaces des microglies réagit aussi avec ceux monocytes et macrophages. Toutefois, il est important de mentionner que malgré cette grande similarité, les cellules microgliales ne proviennent pas des monocytes infiltrés dans le SNC. Plusieurs études ont démontré que les cellules microgliales primitives étaient détectées dans le SNC de souris aussi tôt qu'au 8^e jour embryonnaire, contrairement aux monocytes qui sont détectés seulement au 10^e et 11^e jour [43-45].

Aujourd'hui, le sujet semble définitivement clos. Toutes les preuves vont vers la théorie si improbable de del Rio-Hortega de l'époque qui affirme que les cellules microgliales proviennent de progéniteurs communs aux microglies et aux monocytes/macrophages, dérivant de la couche mésodermale [42].

Par ailleurs, les fonctions exactes de la cellule microgliale au cours de l'embryogenèse sont encore très peu connues. La première et certainement la plus étudiée consiste en son activité phagocytaire pour l'élimination des corps apoptotiques

présents en très grande quantité dans le développement normal du SNC [42, 46, 47]. Ensuite, la cellule microgliale semble jouer un rôle important au cours de l'embryogenèse par le déclenchement d'apoptose neuronale nécessaire au développement. En effet, une étude a démontré que la microglie induit l'apoptose neuronale au niveau de la rétine centrale, dans le but spéculatif de créer de l'espace afin de permettre l'arrivée des axones pour la formation du nerf optique [42, 48]. Finalement, une troisième fonction microgliale primitive qui semble émerger de la littérature est sa capacité angiogénique. Cette hypothèse provient majoritairement du fait que les cellules microgliales arrivent au sein du cerveau avant que celui-ci ne soit vascularisé [49]. De plus, les microglies produisent une grande variété de substances angiogéniques, incluant le « transforming growth factor » et l'interleukine (IL) -1 [50]. Ainsi, les cellules microgliales occupent une fonction vitale dans le développement, mais qu'en est-il au niveau du cerveau adulte?

La microglie pour la surveillance du SNC

Au niveau du cerveau adulte, les microglies sont ubiquitaires et hautement ramifiées à l'état de repos [38]. À ce stade, la cellule possède une activité génomique très faible [51]. Les fonctions exactes de ces cellules quiescentes demeurent toujours peu connues. Toutefois, il est reconnu qu'elles assurent la fonction de sentinelle du SNC [52, 53]. En effet, en utilisant un microscope à deux photons *in vivo*, Nimmerjahn et son équipe ont démontré que la cellule microgliale vérifiait l'homéostasie de son microenvironnement grâce à ses ramifications remarquablement mobiles [53]. Il semblerait que ces ramifications bougeraient de manière cyclique et que l'ensemble du parenchyme cérébral serait complètement exploré au moins une fois toutes les 6 heures [53]! D'ailleurs, cette morphologie est particulièrement favorable aux interactions intercellulaires. En effet, durant leur ronde, les microglies quiescentes vont entrer en contact direct avec les astrocytes, les neurones et les oligodendrocytes environnants, démontrant une grande communication intercellulaire [53].

D'ailleurs, cette communication intercellulaire est à l'origine d'une grande modulation inflammatoire au niveau des cellules microgliales. Effectivement, il a été démontré que les neurones et les astrocytes suppriment l'activation microgliale lorsque le cerveau repose sous des conditions physiologiques optimales (voir figure 1.6) [46, 54]. Ce contrôle implique d'abord une glycoprotéine exprimée à la surface des neurones, la CD200, qui se lie avec son récepteur, celui-ci exprimé à la surface microgliale. Une étude a révélé que chez les souris inactivées au niveau du CD200, les cellules microgliales étaient spontanément activées [54]. Ensuite, l'activité électrique et les facteurs solubles libérés par les neurones intacts maintiennent eux aussi cette inhibition de l'activation microgliale [55, 56]. Ces facteurs solubles incluent les neurotransmetteurs et les facteurs trophiques sécrétés par les neurones environnants. Parmi ces facteurs trophiques, le facteur de croissance neuronale (NGF), le BDNF et la neurotrophine-3 y jouent un rôle important [56]. Par ailleurs, les astrocytes à leur tour sont capables de supprimer l'activation microgliale par la sécrétion d'IL-10 et du TGF- β [46, 57, 58].

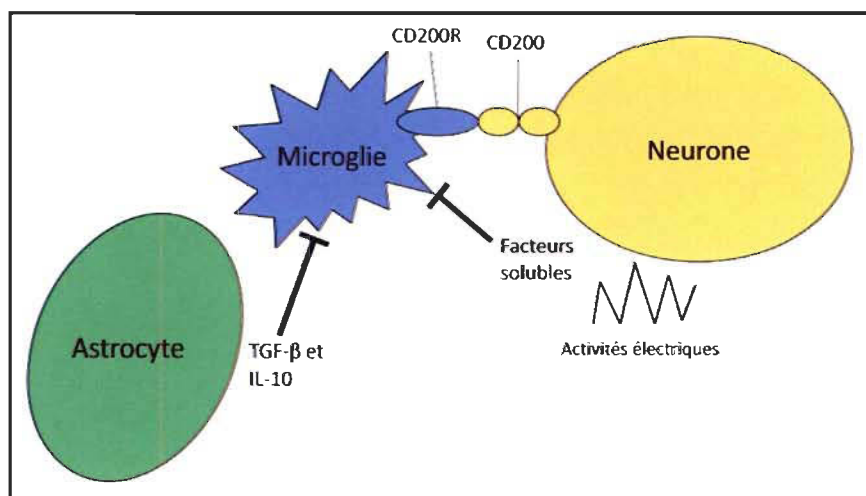


FIGURE 1.6 Préservation de la quiescence microgliale sous conditions physiologiques normales du SNC [46]

Activation microgliale

Ainsi, la cellule microgliale assure la première ligne de défense du SNC. Lorsque l'intégrité cérébrale est altérée, les microglies sont rapidement activées, soit par la perte

d'inhibition amenée par les neurones et les astrocytes, soit par un signal neuronal direct ou soit par un signal de nature neurotoxique (voir figure 1.7). Ainsi, il a été démontré que la cellule microgliale est activée par des facteurs libérés des neurones endommagés tels que la substance P [59], la MMP3 [60], l'ATP [52] et la neuromélanine [61]. De plus, de nombreuses toxines telles que le LPS, le MPTP et le PQ entraînent une réaction microgliale [62-64].

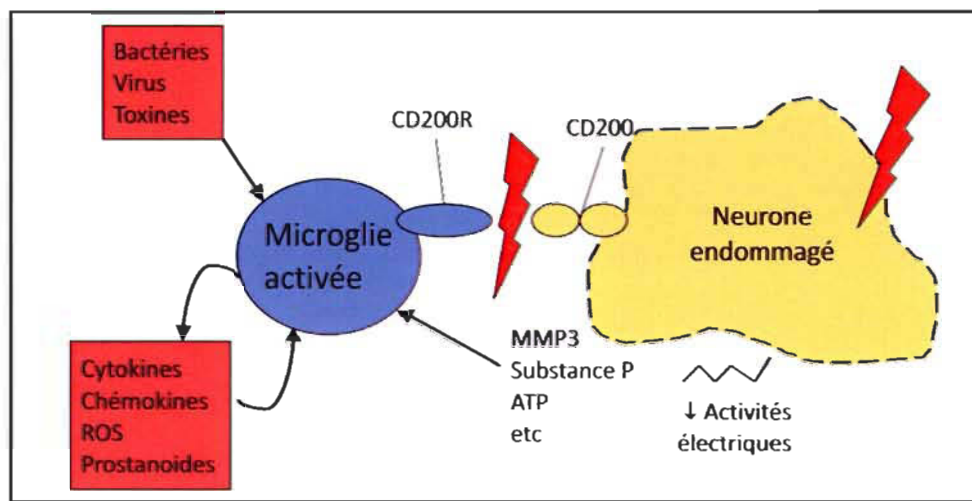


FIGURE 1.7 Bris de l'environnement inhibiteur de l'activation microgliale [46]

Ainsi, la microglie s'adapte à son microenvironnement, et donc aux stimuli présents. Il a d'ailleurs été démontré que cette réponse aux changements s'effectuerait aussi rapidement qu'en quelques minutes [53]! Les processus permettant l'activation microgliale ne sont pas encore complètement décrits. Malgré cela, la réponse si importante pour la protection du SNC semble être due à l'expression par la cellule d'une panoplie de récepteurs qui vont enclencher une réponse immune : les « pattern recognition receptors » (PRR), les récepteurs pour les molécules du complément, les récepteurs Fc, les récepteurs pour les cytokines, chémokines et prostaglandines ainsi que les récepteurs de mort [58] (voir figure 1.8).

D'abord, les PRR sont des récepteurs qui répondent aux « pathogen-associated molecular patterns », lesquels représentent divers éléments exprimés par les microorganismes [65]. Les PRR exprimés par la microglie quiescente incluent les protéines transmembranaires CD11b/CD18, aussi connues comme le récepteur du

complément de type 3 (CR) -3, le récepteur du mannose, le récepteur CD14 et les récepteurs Toll-like (TLR) [58]. Ces récepteurs lient un grand nombre de molécules bactériennes et ils sont rapidement augmentés chez la cellule microgiale activée [66-68]. Le CD14 réagit avec le lipopolysaccharide (LPS), une endotoxine qui provient de la membrane des bactéries Gram négatif (détails à la section 1.3.4.2) [69]. L'ARN double-brin viral se lie au TLR3, tandis que les peptidoglycanes de la membrane des bactéries Gram positif se lient au TLR2 [70, 71].

Ensuite, les récepteurs pour les molécules du complément ainsi que les récepteurs de type Fc provoquent les capacités phagocytaires et l'activation des cellules microgiales (voir figure 1.8) [68]. Les récepteurs FcγRI, RII, et RIII se lient avec les fragments constants des immunoglobulines [72, 73], les CR1, CR3, CR4 lient un composant du complément, le C3bi [74] tandis que le CR1qRP réagit avec le composant C1q [75]. Tous ces récepteurs sont exprimés au niveau de la cellule microgiale quiescente [72, 74, 75].

Par ailleurs, les cellules microgiales quiescentes expriment un grand nombre de récepteurs pour les cytokines, incluant les cytokines pro et anti-inflammatoires (voir figure 1.8) [58]. Les cytokines représentent des petites protéines capables de moduler l'inflammation et seront discutées en détail à la section 1.1.4.1. Ainsi, la microglie à l'état de repos exprime de manière constitutive les récepteurs pour plusieurs cytokines telles que l'interféron-γ (IFN) -γ [76] et le « tumor necrosis factor » (TNF) (récepteur de type I et II ;TNFRI et TNFRII) [77].

D'autre part, les chémokines sont un type de cytokine induisant la chimiotaxie. Ce processus essentiel pour les cellules microgiales leur permet de se rendre sur le site du dommage neuronal ou encore sur le lieu contenant les agents pathogènes. L'expression des récepteurs pour les chémokines a été démontrée au niveau des cellules microgiales *in vitro* ainsi qu'au niveau de plusieurs maladies auto-immunes du SNC (voir figure 1.8) [58]. De plus, la liaison des chémokines avec leur récepteur a été impliquée dans la

médiation de l'inflammation au niveau de plusieurs maladies neurologiques telles que la MP [78].

Ensuite, les prostaglandines (PG) sont des hormones occupant des rôles importants dans plusieurs processus biologiques, dont l'inflammation [79]. Il a été démontré que la cellule microgliale exprimait le récepteur des prostaglandines EP2 et que la liaison de celui-ci avec son ligand provoquait l'activation microgliale [80]. Le rôle des PG dans la neuroinflammation sera abordé en profondeur dans la section 1.1.4.2.

Par ailleurs, le récepteur CD40 est une protéine transmembranaire de 45-50 kDa de la famille des récepteurs TNFR. Elle est exprimée de manière ubiquitaire [81]. Il a été démontré que sa liaison avec le ligand du CD40 (CD40L), lequel est exprimé de manière constitutive chez la cellule microgliale, provoquait l'activation de cette dernière [58]. Plusieurs études ont prouvé l'implication du CD40L dans l'implantation d'une neuroinflammation par la production de la cytokine $\text{TNF-}\alpha$, ainsi que l'induction des enzymes inductibles oxyde nitrique synthase (iNOS) et cyclo-oxygénase-2 (COX)-2 [82, 83]. Ceux-ci seront abordés de manière plus approfondie dans la section 1.1.4.2.

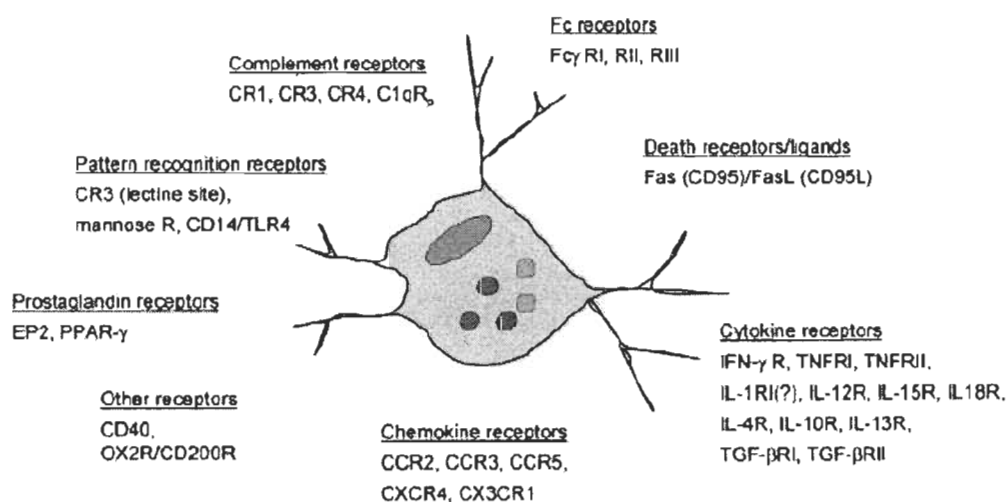


FIGURE 1.8 Les récepteurs qui enclenchent ou amplifient une réponse microgliale [58]

La cellule microgliale activée

Une fois le processus d'activation microgliale enclenché, la cellule entreprend alors de grands changements, autant morphologiques que phénotypiques [84]. Elle va perdre ses ramifications et présenter une forme amiboïde (voir figure 1.9). Elle va entrer en mitose afin d'augmenter sa densité cellulaire et elle va se rendre sur les lieux des dommages neuronaux, ou encore à l'endroit où se trouve l'agent pathogène, par chimiotactisme [85]. L'activité génomique de la cellule microgliale va augmenter en flèche et elle va se mettre à produire une panoplie de facteurs capable d'instaurer une neuroinflammation [51]. Ces facteurs inflammatoires seront présentés en détail à la section 1.1.4.

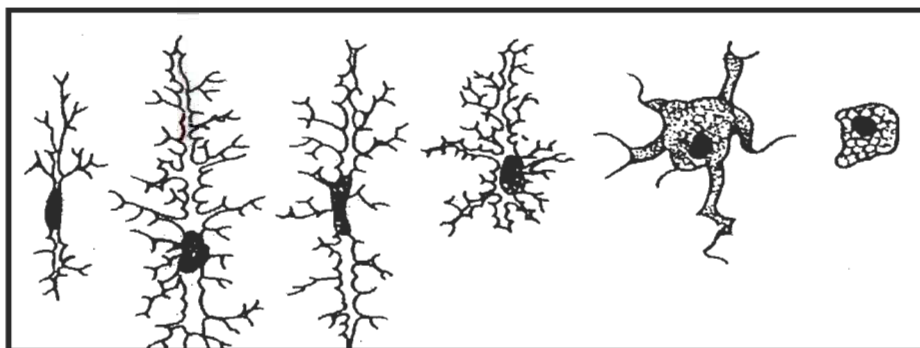


FIGURE 1.9 Morphologie de la microglie. De la gauche vers la droite : transformation de la microglie au repos vers la microglie activée [84]

Ces facteurs inflammatoires sécrétés par la microglie peuvent à leur tour activer d'autres cellules microgliales [86]. Ainsi, une présence soutenue de l'agent initial activateur de la microglie va provoquer une suractivation de ce type cellulaire. Cette boucle d'activation microgliale est considérée aujourd'hui comme un important acteur au sein de la progression de plusieurs maladies neurodégénératives telles que la MP et la MA [87].

1.1.4 Facteurs médiateurs de la neuroinflammation

Au niveau du cerveau sain, les tissus cérébraux provoquent un environnement immunosuppresseur, afin de garder les fonctions valides. Tel que mentionné précédemment, cette immunosuppression est supportée par le facteur TGF- β , l'activité

électrique des neurones ainsi que par la BHE. Toutefois, sous certaines conditions telles qu'une infection ou une maladie neurodégénérative, les cellules immunocompétentes deviennent activées et se mettent à produire une panoplie de facteurs médiateurs de l'inflammation. Bien qu'une grande variété de cellules soient en mesure de produire de tels facteurs (microglies, cellules immunitaires périphériques infiltrées, oligodendrocytes, astrocytes), il a été démontré que la cellule microgliale en était la principale source [46]. Afin de ne pas surcharger ce mémoire, il ne sera question que des facteurs médiateurs de la neuroinflammation sécrétés par la cellule microgliale. La figure 1.10 en recense les principaux.

Abréviation	Nom complet	Fonction/Effet	Réf.
IL-1α/β	Interleukine-1 α/β	Pro-inflammatoire	[88, 89]
IL-18	Interleukine-18	Pro-inflammatoire	[90]
IL-6	Interleukine-6	Pro-inflammatoire	[91-93]
TNF-α	« Tumor necrosis factor- α »	Pro-inflammatoire	[94, 95]
LT- α	Lymphotoxine- α	Pro-inflammatoire	[96]
IFN-γ	Interféron- γ	Pro-inflammatoire	[97]
M-CSF	« Macrophage colony stimulating factor »	Prolifération	[98]
GM-CSF	« Granulocyte -macrophage colony stimulating factor »	Prolifération	[99]
IL-5 -12 -15	Interleukine-5 -12 -15	Prolifération	[100]
IL-4 -10 -13	Interleukine-4 -10 -13	Immunosuppresseur	[101-103]
IL-2	Interleukine-2	Neurotrophique	[104]
NGF	« Nerve growth factor »	Neurotrophique	[48]
BDNF	« Brain derived neurotrophic factor »	Neurotrophique	[105]
NT-3 -4	Neurotrophine-3 -4	Neurotrophique	[106]
PGE₂	Prostaglandine E2	Proinflammatoire	[107]
NO	Oxyde nitrique	Neurotoxique	[107]
O₂•	Superoxide	Neurotoxique	[107]
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène	Neurotoxique	[108]
OH•	Radical hydroxyle	Neurotoxique	[109]
ONOO•	Peroxynitrite	Neurotoxique	[109]

FIGURE 1.10 Facteur médiateur de la neuroinflammation produits par les cellules microgliales [107]

1.1.4.1 Les cytokines

Le titre du plus important médiateur de l'immunité innée au niveau du SNC va incontestablement aux cytokines. Ces petites protéines d'environ 100-200 aminoacides sont solubles et essentielles pour la communication intercellulaire dans l'organisme. Particulièrement produite par les cellules immunocompétentes, la microglie en est la principale source au sein du SNC. L'étude des cytokines est particulièrement complexe vu leurs nombreuses caractéristiques. En effet, elles sont pléiotropiques (plusieurs cibles), ont des fonctions redondantes, sont parfois antagonistes et finalement, peuvent produire une fonction en synergie avec une autre cytokine! Malgré tout, nos connaissances sur ces modulatrices inflammatoires ne cessent d'augmenter.

Vu la diversité des cytokines ainsi que la complexité dans la nomenclature et la classification, je présenterai uniquement celles pour qui l'implication au sein du SNC a été démontrée. Ainsi, six principaux groupes sont retrouvés au niveau cérébral : les IL, les TNF, les IFN, les chémokines ainsi que les « Colony stimulating factors » (CSF).

Les IL

Les IL ont été nommées ainsi, car les premières observations semblaient montrer qu'elles étaient importantes pour la communication intercellulaire entre les leucocytes. Cette nomenclature demeure très « neutre », puisque tous les IL ne possèdent ni la même fonction, ni la même structure, ni le même récepteur. Ainsi, plusieurs familles de cytokines ressortent des IL, classées selon leurs fonctions.

La famille IL-1 inclut l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-18. Une caractéristique commune de ces cytokines est qu'elles sont relâchées de la cellule en tant que précurseur protéique et nécessitent un clivage par une protéase (le plus souvent la caspase-1) pour être activées [110]. L'expression microgliale de l'IL-1 a été associée avec plusieurs pathologies telles que la MA, les accidents cérébro-vasculaires, et la MP [111]. De plus, il a été démontré que l'IL-1 contribuait directement à la neurodégénération [112]. Chez les souris déficientes au niveau de l'expression de l'IL-1, l'activation microgliale et l'expression

de facteurs inflammatoires subséquente sont retardées suite à un dommage neuronal, contrairement à ce qui se passe chez les souris saines [89]. Aussi, à l'aide d'une solution pure de cytokine IL-1 β , Downen et son équipe ont démontré que cette cytokine était neurotoxique au niveau d'une culture primaire de neurones humains [113].

Par ailleurs, l'IL-6 est une cytokine plurifonctionnelle reconnue pour son implication dans l'inflammation et la réponse immune [91, 110]. En effet, plusieurs études ont démontré la hausse de cette cytokine dans le sang, le liquide cébrospinal ainsi qu'au niveau du tissu cérébral des personnes atteintes de la SP [114]. Au niveau de la MA, il a été démontré que la cytokine IL-6 participait à la transformation des plaques diffuses en plaques primitives, responsables des démences associées à la maladie [93]. De plus, l'augmentation de l'expression de la cytokine dans la MP a été décrite par Hofmann et son équipe. En fait, il semblerait que le niveau d'IL-6 corrélait avec la sévérité de la MP [92, 115]. Au niveau des études *in vivo*, une surexpression de cette IL est associée à une augmentation du risque de développer une maladie neurologique [116].

D'autre part, les IL-10, IL-13 et IL-4 exprimées par la cellule microgiale jouent un grand rôle inhibiteur de l'inflammation [101, 103, 117, 118]. Il semblerait que l'expression de la cytokine IL-10 soit inversement proportionnelle à la progression de la SP [119]. Par ailleurs, une étude a présenté la capacité des cytokines IL-13 et IL-4 d'induire la mort des cellules microgiales activées, démontrant ainsi leur potentiel anti-inflammatoire [102].

Les TNF

Les TNF ont été nommés ainsi vu leur capacité à induire la mort par nécrose des cellules tumorales. Aujourd'hui, il est reconnu que cette cytokine est beaucoup plus une modulatrice inflammatoire qu'une inductrice de nécrose. Cette famille inclut le TNF- α et la lymphotoxine- α (LT- α ; anciennement nommé TNF- β). Le TNF- α est une protéine transmembranaire : la portion extracellulaire réagit avec les protéases entraînant un

clivage et la relâche d'une cytokine soluble. La LT- α , quant à elle, est une protéine soluble et sécrétée, hautement inductible [120].

Les propriétés pro-inflammatoires et proapoptotiques de TNF- α et de LT- α sont redondantes. D'ailleurs, les récentes recherches sur le sujet ont démontré l'effet bénéfique de l'inhibition de la voie activée par la TNF- α et la LT- α [121]. Une inhibition aiguë de la production et de la sécrétion de la cytokine TNF- α améliore de manière significative les dommages neuronaux reliés à un trauma chez les rongeurs [122, 123]. De plus, il a été démontré que l'expression des cytokines TNF- α et LT- α était fortement augmentée en situation de maladies neurodégénératives telles que la MP [115].

Les IFN

Les IFN interfèrent avec la réplication de virus, expliquant leur nomenclature. Le seul retrouvé au sein du SNC est l'IFN- γ . Celui-ci est une cytokine impliquée dans l'immunité contre les virus, bactéries, parasites et cellules tumorales. Il module aussi la réponse immune.

Cette cytokine n'est pas retrouvée au niveau du SNC sain. Toutefois, il a été démontré que la microglie l'exprimait en réponse aux cytokines IL-8 et IL-12 [97]. De plus, il a été démontré que l'IFN- γ provoquait une forte activation microgliale avec sa production subséquente de ROS et TNF- α [124]. Puisque ces produits dérivés de la cellule microgliale ont été impliqués dans les pathologies du SNC, l'IFN- γ semble lui aussi être une protéine clé. En effet, il a été démontré que le sérum des malades parkinsoniens présentait une concentration élevée en IFN- γ [115]. Par ailleurs, une étude a démontré que l'IFN- γ inhibe la prolifération des astrocytes, appuyant son rôle pro-inflammatoire [125].

Les chémokines

Les chémokines sont des cytokines chimiotactiques, c'est-à-dire qu'elles régulent la migration (chimiotaxie) et l'état d'activation des cellules immunocompétentes. Elles représentent une famille de petites protéines solubles d'environ 8-14 kDa et présentent peu d'homologie structurelle entre elles, quoiqu'elles présentent toutes deux ou quatre cystéines conservées [126]. Elles sont donc classées en quatre groupes : CXC, CC, C et CX₃C. Il a été démontré que les chémokines étaient modulées à la hausse en situation de pathologies neurologiques [127].

Les « colony-stimulating factor » (CSF)

Les CSF sont des glycoprotéines capables d'induire la croissance et la prolifération cellulaire. Tel que démontré à la figure 1.10, les IL-5, -12, -15, le macrophage-CSF (M-CSF) ainsi que le granulocyte/macrophage-CSF (GM-CSF) sont des initiateurs de mitose microgliale [99, 100]. Plusieurs études ont présenté l'expression de ces cytokines suite à l'activation microgliale [100, 128, 129]. Il semble que les CSF soient plutôt protecteurs que toxiques. En effet, le GM-CSF a diminué la mortalité des neurones DAergiques dans un modèle de souris traitées avec la neurotoxine oxydante MPTP [130].

1.1.4.2 Les Substances Oxygénées Réactives (ROS) et les PG

Les cellules microgliales sont les principales modulatrices de la neuroinflammation par le grand nombre de facteurs qu'elles expriment (voir figure 1.11). Parmi ceux-ci, les ROS sont des petites molécules qui incluent l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) ainsi que l'oxyde nitrique (NO). Tous ces ROS ne sont pas extrêmement réactifs. Par exemple, la réactivité du NO et du $O_2^{\bullet-}$ est plutôt faible, mais extrême lorsque les deux réagissent ensemble pour former le peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$). Ainsi, il a été démontré que les ROS, par la formation d'agrégats protéiques, contribuent à l'évolution de plusieurs maladies

neurodégénératives telles que la MP, la MA et la sclérose amyotrophique latérale [131-133].

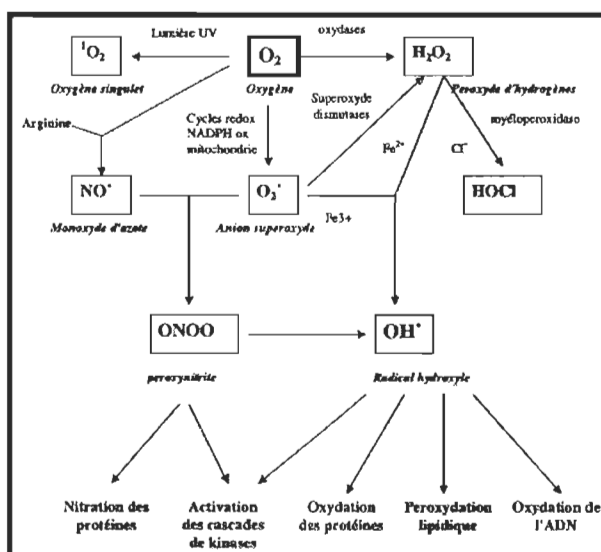


FIGURE 1.11 Différents ROS impliqués dans le SNC [134]

Le NO possède une grande diversité d'effets biologiques, tant bénéfiques que toxiques [135]. Il est synthétisé par l'oxyde nitrique synthase (NOS). Celle-ci est exprimée de manière constitutive et ubiquitaire au niveau du tissu cérébral [136]. La cellule microgliale, quant à elle, exprime la forme inducible de NOS (iNOS) qui possède un potentiel de synthèse bien plus grand que les formes constitutives [137]. Ainsi, lorsqu'il est engendré en grande quantité par iNOS, le NO devient neurotoxique [138]. Les mécanismes par lesquels celui-ci est toxique ne sont pas encore tout à fait clairs. Il semble que le NO provoque un dommage à l'ADN, une peroxydation lipidique ainsi qu'une déplétion d'énergie, provoquant la mort de la cellule [139]. Plusieurs analyses de souris knock-out pour l'enzyme iNOS ont démontré le rôle important du NO dans la médiation de la mort cellulaire [140]. De plus, l'inhibition de l'activité d'iNOS diminue la progression de la maladie au sein de modèle animal de la MP [141] et de la MA [142], suggérant ainsi le rôle important du NO dans les maladies neurodégénératives. Par ailleurs, il a été démontré que les cytokines inflammatoires provoquaient l'expression de l'iNOS chez la cellule microgliale [139].

Ensuite, la cellule microgliale activée exprime l'enzyme NADPH oxydase (NOX) qui génère une grande quantité d' O_2^{\bullet} . Tel que mentionné précédemment, cet anion réagit rapidement avec le NO pour produire le $ONOO^-$ [109, 143]. En plus d'être hautement réactif, le $ONOO^-$ peut se dégrader et produire de l' OH^- [109]. En fait, ce $ONOO^-$ semble être la source de la toxicité du NO. Une étude a démontré que des souris déficientes pour iNOS étaient résistantes à la toxicité du MPTP [141].

Il est important de mentionner l'implication de l'enzyme COX dans la neuroinflammation. Deux formes de COX ont été identifiées au niveau du SNC et sont référées en tant que COX-1 et COX-2. La COX-1 est exprimée de manière constitutive et ubiquitaire. Elle joue un rôle dans l'homéostasie. La COX-2 quant à elle, au niveau du cerveau sain, est retrouvée à un niveau très faible. En fait, c'est une forme qui peut être induite par plusieurs stimuli incluant les IL-1, le $TNF-\alpha$ et le LPS [79]. Cette enzyme catalyse la formation de PG à partir de l'acide arachidonique. Ces dernières sont reconnues comme d'importantes molécules dans les processus neuroinflammatoires. En effet, au sein du SNC, l'induction de COX-2 amène la production de PGE2, laquelle amplifie la réponse gliale et ses nombreux facteurs toxiques [144]. D'ailleurs, il a été démontré que l'ablation génétique ou pharmacologique de COX-2 atténuait la toxicité apportée par l'administration de MPTP [145, 146].

1.1.5 La cellule microgliale : Amie ou Ennemie?

Le rôle exact de la cellule microgliale est un sujet controversé depuis longtemps. Malgré les nombreuses études démontrant sa capacité à produire plusieurs molécules cytotoxiques telles que le NO et le $TNF-\alpha$, d'autres études ont démontré son rôle neuroprotecteur [147]. En effet, les cellules microgliales activées ont aussi pour fonctions de réparer les tissus et de disposer des débris après les dommages, au même titre que les macrophages dans les organes périphériques. La microglie possède tout l'arsenal requis pour diminuer l'inflammation toxique par sa production de facteurs neurotrophiques, de croissance et anti-inflammatoires (voir figure 1.10). En fait, les effets cytotoxiques dérivés de la cellule microgliale ne sont normalement présents que

pour détruire les micro-organismes envahissants. Toutefois, une suractivation microgliale, un mauvais contrôle de l'activation ou encore une présence soutenue du stimulus initial (comme dans les maladies neurodégénératives) sont des facteurs pouvant expliquer la transformation de la gentille microglie en microglie meurtrière. Il ne s'agit donc pas d'inhiber complètement l'activation microgliale, mais plutôt de la contrôler.

1.2 La MP

La MP affecte l'être humain depuis la nuit des temps, tel qu'on peut le constater dans les différents écrits. Par exemple, on trouve des descriptions de syndromes parkinsoniens dans les anciens textes ayurvédiques de l'Inde, datant de 4 500 à 1 000 ans avant J.C [148]. Dans ces écrits, un traitement pour cette pathologie utilise un légume tropical, le *Mucuna Pruriens*, lequel est reconnu aujourd'hui comme source naturelle de lévodopa (L-dopa) [149]! Léonard de Vinci (1452-1519) lui-même, grand peintre, philosophe et anatomiste, décrivit dans un de ses cahiers de notes : « *you will see.....those who.....move their trembling parts, such as their heads or hands without permission of the soul; (the) soul with all its forces cannot prevent these parts from trembling* » [150].

Toutefois, le mérite revient à un médecin britannique, le Dr. James Parkinson (1755-1824), pour avoir reconnu et décrit les innombrables symptômes de la MP et pour en faire non pas un syndrome, mais bien une maladie à part entière. Dans son essai « *Essay on the Shaking Palsy* », Parkinson décrivit « un mouvement tremblant involontaire; une force musculaire diminuée dans les parties non actives et même lorsque soutenues, avec une tendance à courber le tronc vers l'avant, et de passer de la marche à la course; les sens et l'intellect n'étant pas atteints » [151]. Quarante ans plus tard, en 1861, le docteur Jean-Martin Charcot « redécouvre » la maladie. Il décrit le « ralentissement dans l'accomplissement des mouvements, sans affaiblissement réel de la puissance motrice ». Ainsi, si Parkinson avait bien décrit le tremblement et l'akinésie, c'est à Charcot que l'on doit le troisième élément de la triade clinique : la rigidité musculaire ou l'hypertonie, décrite comme en « tuyau de plomb ». Finalement, pour

éviter les confusions avec les autres maladies paralytiques, Charcot décida de rendre hommage à l'homme qui fut le premier à rassembler les symptômes si diversifiés, et c'est ainsi que la maladie de Parkinson fit son entrée [152].

En 1913, Marcus Guggenheim (1885-1970) fut le premier à isoler la L-dopa à partir de graine de haricot *Vicia faba* [153, 154], une substance qu'il jugea d'abord sans effet biologique. En effet, l'administration de L-dopa à l'animal, à des doses qui se sont révélées plus tard beaucoup trop faibles, n'avait pas permis de mettre en évidence ses remarquables propriétés stimulantes. Il fallu attendre le début des années 1960 pour que le Dr. Arvid Carlsson (1923 -) mette en évidence le rôle de la dopamine (DA) en tant que neurotransmetteur [155]. D'ailleurs, les travaux de Carlsson lui valurent le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2000. C'est ainsi qu'en 1965 arrivèrent les premiers essais cliniques avec la dopamine, puis de la L-dopa (cette dernière fut commercialisée en 1970). Depuis, les médecins ont à leur disposition de nombreuses formes de L-dopa, et de nombreux agonistes.

Actuellement, des progrès considérables ont été accomplis dans la définition, le diagnostic, l'évolution et le traitement de la MP. Toutefois, le pas décisif sera franchi quand l'étiologie de cette terrible maladie sera enfin connue. Près de 200 ans après la description initiale, ce n'est toujours pas le cas.

1.2.1 Épidémiologie de la MP

La MP est la 2^e maladie neurodégénérative la plus commune après la MA [156]. Il est évalué qu'elle touche environ 5,2 millions de personnes à travers le monde [157]. La société Parkinson Canada estime à 100 000 le nombre de gens atteints au Canada.

Bien que la MP soit présente à l'échelle planétaire, indépendamment de la situation socio-économique, les statistiques relatives à sa morbidité varient considérablement d'un endroit à l'autre. D'abord, les hommes semblent plus touchés que les femmes (55 hommes pour 45 femmes) [158]. Ensuite, il semble que l'incidence

de la MP varie selon l'ethnie. En effet, la MP est plus présente chez les personnes hispaniques, suivi des blancs non hispaniques, des Asiatiques et enfin de la race noire [159].

Cette maladie est fortement associée à l'âge. En effet, elle débute généralement dans la deuxième moitié de la vie, soit entre 55 et 65 ans. Seulement 4 % des patients développeront des symptômes avant 50 ans [159]. Sa prévalence augmente avec l'âge : 1-2 % chez les gens de 65 ans et 3-5 % chez les gens de plus de 85 ans [160]. Le risque de mortalité des gens atteints de la MP n'est qu'environ 1,6 fois plus élevée que la normale [161].

Puisque cette maladie est fortement associée à l'âge, il devient évident qu'elle aura une prévalence plus importante dans les pays développés où l'espérance de vie ne cesse d'augmenter.

1.2.2 Sémiologie de la MP

Comme toute pathologie, c'est une bonne connaissance du tableau clinique et des complications évolutives qui permet de soulager le malade de ses difficultés quotidiennes. D'ailleurs, cette affirmation est d'autant plus cruciale pour la MP, puisqu'à ce jour, aucun traitement curatif n'est encore disponible. De plus, la MP est une maladie multi systémique, avec une multitude de symptômes diversifiés. Elle n'affecte donc pas tous les patients de la même façon. Les symptômes moteurs sont les mieux documentés, les mieux connus et les plus facilement identifiables. Ceux-ci constituent une triade clinique : le tremblement au repos, l'akinésie/bradykinésie et la rigidité musculaire [162]. Toutefois, il est important de mentionner que la MP amène beaucoup de symptômes non moteurs, ceux-ci moins connus.

1.2.2.1 Symptômes moteurs de la MP

Le premier élément de la triade parkinsonienne est sans doute le plus connu. Il s'agit du **tremblement au repos** constaté lorsque le membre se trouve en position de relâchement musculaire complète. D'ailleurs, ce tremblement est diminué par le mouvement volontaire, surtout en début de maladie. Les tremblements sont prédominants au niveau des membres supérieurs et plutôt au niveau de la main ou même d'un seul doigt [162]. De 50 % à 70 % des MP débutent par ce symptôme [162]. Pourtant, tous les tremblements ne sont pas parkinsoniens, et tous les parkinsoniens ne tremblent pas! En effet, un parkinsonien sur quatre n'en sera jamais affecté [163].

Ensuite, **l'akinésie** est caractérisée par une diminution ou une disparition des mouvements spontanés et automatiques et donc un défaut d'initiation du mouvement. « Le parkinsonien est condamné aux mouvements volontaires à perpétuité! » disait Charcot. On parle aussi de **bradykinésie** comme étant l'allongement du temps d'exécution d'un mouvement et d'**hypokinésie** qui traduit une diminution dans l'amplitude du mouvement. Ainsi, l'aisance du mouvement est perdue et chaque acte moteur doit être pensé et voulu, ce qui engendre une très grande fatigue vu la dépense d'énergie constante. Chez le parkinsonien, ces trois kinésies sont conjuguées et se traduisent par une variété de symptômes : un visage figé et sans expression (hypomimie), une voix faible et monocorde (hypophonie), un trouble du langage (dysarthrie), une difficulté à avaler (dysphagie) et une diminution progressive de la taille des lettres dans l'écriture (micrographie) [162, 164-167].

Le troisième élément de la triade parkinsonienne est la **rigidité musculaire** ou hypertonie extrapyramidale. Elle contribue à la sensation de raideur, d'ankylose, de muscle comme « en tuyau de plomb ». Elle est due à une activité musculaire permanente par incapacité à obtenir un relâchement complet [162, 166]. Cette hypertonie prédomine au niveau de la colonne vertébrale et de la racine des membres. C'est pourquoi la douleur siège préférentiellement au niveau de la nuque, du dos et des épaules. Par

ailleurs, cette rigidité cède souvent par à-coups : c'est le phénomène de la roue dentée [164, 167].

Les kinésies de la MP jumelées avec la rigidité musculaire sont responsables de la posture caractéristique des parkinsoniens : flexion du corps, dos courbé, tête penchée vers l'avant, genoux, bras courbés et collés au corps (voir figure 1.12). La marche devient pénible : petits pas, les pieds ayant tendance à traîner au sol, le patient qui a tendance à courir après son centre de gravité en accélérant le pas (festination). Un phénomène de blocage se produit aussi parfois à la marche, ce qu'on appelle « freezing ». Par contre, toutes ces caractéristiques engendrant une instabilité posturale sont considérées comme un signe tardif.

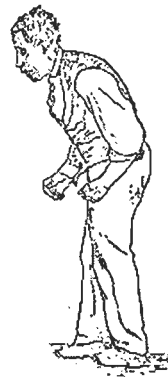


FIGURE 1.12 Posture caractéristique de la MP [168]

1.2.2.2 Symptômes non moteurs de la MP

Bon nombre de symptômes non moteurs font partie intégrante de la MP. La plupart furent décrits par James Parkinson lui-même [151]. En dépit de leur impact, ces symptômes ne sont pas encore bien reconnus au niveau clinique. De plus, de nombreuses études démontrent que plusieurs d'entre eux peuvent survenir avant les symptômes moteurs, démontrant un rôle prometteur comme marqueur préclinique [169]. Ces symptômes non moteurs incluent des troubles psychologiques, sensitifs, du sommeil et autonomiques.

Troubles psychologiques dans la MP

Mal reconnus et difficiles à diagnostiquer, les troubles psychologiques dans la MP sont une inquiétude puisqu'ils sont responsables d'une partie de la perte de qualité de vie ressentie par les parkinsoniens. En effet, la dépression et l'anxiété peuvent toucher jusqu'à 40 % des parkinsoniens [170, 171]. Le syndrome de démence est ressenti chez près de 80 % des patients, spécialement chez les plus âgés [172].

Troubles sensitifs dans la MP

Les phénomènes sensitifs sont très fréquents dans la MP et concernent jusqu'à 50 % des patients [173]. D'abord, la douleur est commune dans la maladie. Elle peut être due aux fluctuations motrices ou encore aux dystonies matinales. Une douleur profonde viscérale peut aussi être ressentie dans la maladie [173]. Par ailleurs, près de 90 % des parkinsoniens mentionnent un trouble sensitif de l'olfaction, et ce symptôme est même prometteur à titre de marqueur préclinique [174].

Trouble du sommeil dans la MP

Il est estimé qu'environ 65 % des gens atteints de la MP développeront un problème de sommeil [170]. D'ailleurs, dans son étude sur 149 parkinsoniens, Kumar et son équipe ont démontré que 42 % des parkinsoniens souffraient de troubles de sommeil comparé à 16 % chez les gens en santé. Parmi ceux-ci, 32 % souffraient d'insomnie, 32 % de cauchemar et 15 % de somnolence diurne [175].

Troubles autonomiques dans la MP

Les troubles autonomiques de la MP restent très inconstants d'un patient à l'autre. On distingue d'abord l'hypersialorrhée qui résulte d'une stase salivaire par diminution des mouvements automatiques de déglutition. Ce trouble est retrouvé chez environ 70 % des parkinsoniens, surtout tardivement dans l'évolution de la maladie [176].

L'hyperséborrhée est aussi constatée fréquemment chez les gens atteints de la MP, ce qui leur donne un aspect de visage pommadé [177]. Dans près de 30 % des cas de MP, on remarque des troubles digestifs qui consistent surtout en une constipation reliée à une diminution de la mobilité intestinale [176]. Des conduites d'hypersexualité et des problèmes de perte de contrôle de l'impulsivité viennent récemment d'être associés avec la dopathérapie (celle-ci sera abordée de manière plus approfondie à la section 1.4.1.1) [178].

1.2.2.3 Le diagnostic de la MP

Le diagnostic initial de la maladie est purement clinique. Il est posé en présence d'au moins deux des trois symptômes de la triade clinique [158, 179]. Le seul élément de certitude viendrait avec l'examen neuropathologique *post-mortem* du patient. Normalement, avec les éléments cliniques et une sensibilité à la dopathérapie, nul besoin d'examens complémentaires. Par contre, le caractère typique de la symptomatologie peut être difficile à évaluer, ce qui nécessite parfois ce recours aux examens complémentaires. Deux examens d'imageries sont disponibles à cette fin.

Tomographie par émission de positrons

La tomographie par émission de positrons est une technique d'imagerie fonctionnelle qui permet de suivre dans le temps et dans l'espace l'évolution d'un traceur spécifique marqué par un radio-isotope. Dans la MP, le principal ligand utilisé est la [^{18}F] fluro-dopa. La DA ainsi marquée va se fixer sur les neurones DAergiques traduisant leur activité. Une réduction du marquage est observée au stade préclinique de la maladie et permet de détecter des patients à risque jusqu'à trois à six ans avant l'arrivée des premiers symptômes [167, 180].

Tomographie par émission de simples photons

Le principe de la tomographie par émission de simples photons repose sur l'utilisation d'un ligand radio marqué à l'iode 123, l' ^{123}I ioflupane. Il est injecté par voie

veineuse et se fixe aux transporteurs de la dopamine (DAT) sur les neurones DAergiques. Dans la MP, la diminution de la densité de DAT dans le striatum se traduit par une diminution de la fixation du traceur. Cette perte de neurones DAergiques peut s'observer à un stade préclinique [167, 181].

1.2.2.4 Évolution clinique de la MP

L'évolution et la vitesse de progression de la maladie restent très variables d'un sujet à l'autre, chaque patient présente un profil évolutif particulier. Toutefois, trois principales étapes peuvent être distinguées dans ce cours évolutif (voir figure 1.13).

Phase « Lune de miel »

Lorsque le diagnostic est posé et le traitement instauré, les symptômes disparaissent : tout redevient comme avant! C'est la première étape, la période « lune de miel » entre le patient, le médecin et la maladie. Cette période de satisfaction va durer entre cinq et dix ans [167]. L'évolution reste discrète et bien contrôlée. Pendant des années, le patient va bien, mais tranquillement, son traitement augmente, se complique.

Phase de déclin

Ensuite, le patient entre dans sa deuxième étape : la phase de déclin. La symptomatologie augmente et les premières complications apparaissent. Le patient adopte graduellement la posture caractéristique de la MP (voir figure 1.12). Tous les gestes de la vie quotidienne deviennent plus lents, plus difficiles. Les dyskinésies s'amplifient : c'est la période des fluctuations motrices. Les périodes « ON-OFF » apparaissent : un passage imprévisible d'un état quasi parfait « ON » à un état « OFF » où les symptômes parkinsoniens moteurs et non moteurs s'aggravent dramatiquement. Au cours de l'évolution de la maladie, les symptômes et les complications de la phase de déclin s'accroissent et s'amplifient.

Phase finale

L'état du patient se dégrade, l'autonomie disparaît. Les moyens thérapeutiques s'épuisent. Les réponses « ON » sont de plus en plus rares, et la réponse à la dopathérapie s'amenuise. Le patient devient très fragile. Les troubles de déglutition à ce stade sont très importants, engendrant un amaigrissement. L'état général du patient s'altère. La marche est devenue impossible. Les sollicitations de l'entourage se multiplient compte tenu de la lourdeur de la pathologie. L'institutionnalisation devient nécessaire. Le malade finit par succomber d'une pathologie diverse, dans la plupart des cas, pneumonie ou insuffisance respiratoire [182].

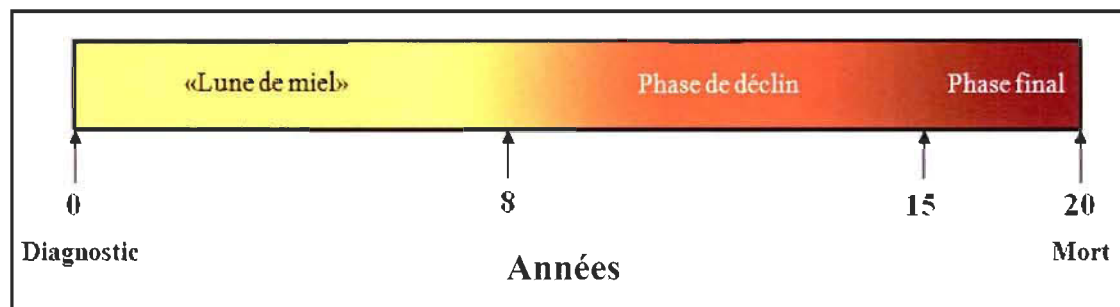


FIGURE 1.13 Évolution de la MP

1.2.3 Physioanatomopathologie de la MP

Les caractéristiques physioanatomopathologiques de la maladie sont aujourd'hui bien documentées et se traduisent par une dépopulation des neurones DAergiques pigmentés de la substance noire (SN) ainsi qu'une présence histologiquement détectable de corps de Lewy (CL) dans les neurones survivants. Mentionnons toutefois que l'ensemble des systèmes DAergiques est touché à des degrés divers.

1.2.3.1 Anatomie du contrôle moteur

Les ganglions de la base, anciennement nommés noyaux gris centraux, partagent le contrôle de la motricité avec le cervelet. Ensemble, ces structures cérébrales permettent le démarrage, la coordination, la modulation et l'arrêt du mouvement. Les

ganglions de la base, lesquels sont situés dans le télencéphale et le mésencéphale, sont particulièrement impliqués au niveau du démarrage du mouvement ainsi qu'au niveau des gestes appris et exécutés de manière automatique. Ils sont constitués de quatre noyaux : le striatum (noyau caudé et putamen), le globus pallidus (GP; latéral (GPl) et médian (GPM)), le noyau subthalamique (NST; aussi appelé corps de Luys) et la SN (voir figure 1.14).

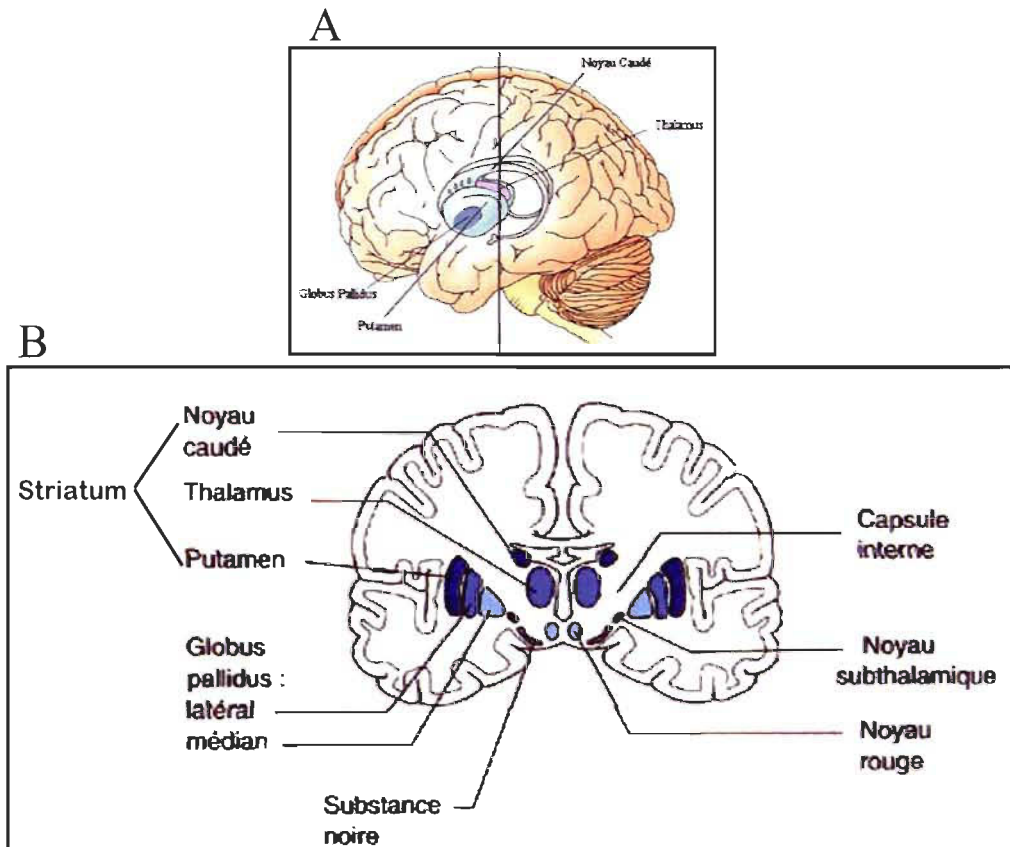


FIGURE 1.14 (A) Niveau de la coupe de la figure B (B) Anatomie des ganglions de la base

Ainsi, une fois le mouvement commandé, l'information arrive au cortex prémoteur, qui va le transmettre aux ganglions de la base, lesquels vont intégrer la commande. L'information va aboutir au cortex moteur pour son exécution. Ces circuits neuronaux fonctionnent avec le neurotransmetteur DA (voir figure 1.15). Celle-ci est produite quasi exclusivement par un des ganglions de la base situé dans la partie haute du tronc cérébral : la SN (voir figure 1.14).

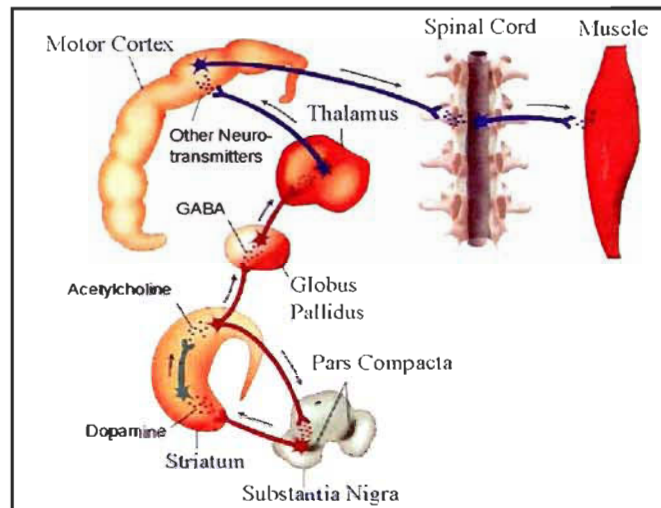


FIGURE 1.15 Les circuits neuronaux impliqués dans le contrôle moteur [183]

Cette SN, aussi appelée *locus niger* ou *substantia nigra*, est une masse volumique de neurones constituée de deux régions : une partie réticulée, ventrale, riche en neurones GABAergiques qui rejoignent le GB, et une partie compacte (SN pars compacta; SNpc), dorsale et riche en neurones DAergiques.

Quatre principales voies fonctionnent avec la DA (voir figure 1.16). D'abord, la **voie méso limbique** associe des neurones de l'aire tegmentale ventrale à plusieurs structures du système limbique. Cette voie est importante pour la mémoire et la motivation de nos comportements. Ensuite, la **voie méso-corticale** débute aussi à l'aire tegmentale ventrale, mais innerve le cortex frontal et les structures avoisinantes. Certaines évidences montrent qu'un mal fonctionnement de cette voie pourrait être à l'origine des symptômes de la schizophrénie. Par ailleurs, la **voie tubéro-infundibulaire**, qui va de l'hypothalamus à l'hypophyse, influence la sécrétion de certaines hormones. Finalement, la voie majoritaire qui sera abordée dans ce mémoire, la **voie nigrostriée** projette ses axones de la substance noire au striatum (voir figure 1.16).

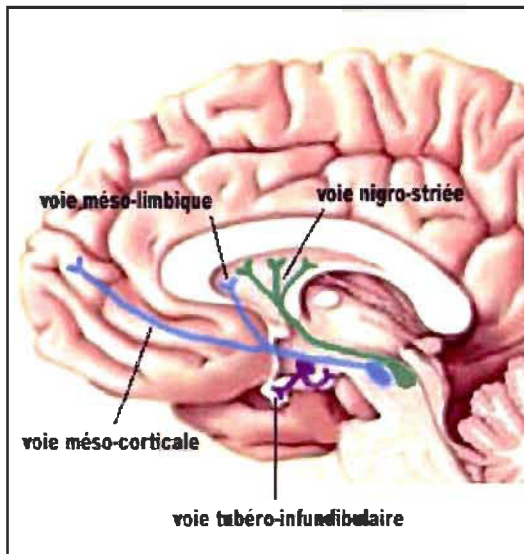


FIGURE 1.16 Les systèmes DAergiques, incluant la voie nigrostriée

1.2.3.2 Déplétion des neurones DAergiques dans la MP

La MP représente le trouble le plus commun des ganglions de la base. La déplétion progressive des neurones DAergiques de la SN est maintenant une caractéristique de la MP bien reconnue [165]. D'ailleurs, ce caractère est facilement observable à l'examen anatomique *post-mortem* de cerveaux parkinsoniens (voir figure 1.17 et 1.18). En effet, les neurones DAergiques ont une coloration naturelle noire, due à la présence de mélanine, un produit de dégradation de la DA [184]. Cette coloration est fortement diminuée chez les patients parkinsoniens [165].

Ainsi, au cours de la première phase non clinique de la MP, les neurones DAergiques de la SNpc disparaissent progressivement, mais les neurones restants fonctionnent au maximum de leur capacité pour fournir la bonne quantité de DA. Cette évolution dans la déplétion des neurones a comme conséquence que le malade ne ressent les premiers symptômes qu'après une perte d'environ 50 % [165, 185, 186].

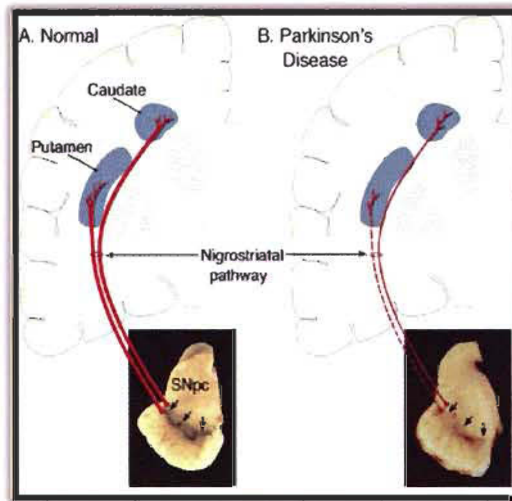


FIGURE 1.17 Caractéristiques neuropathologiques de la MP [165]

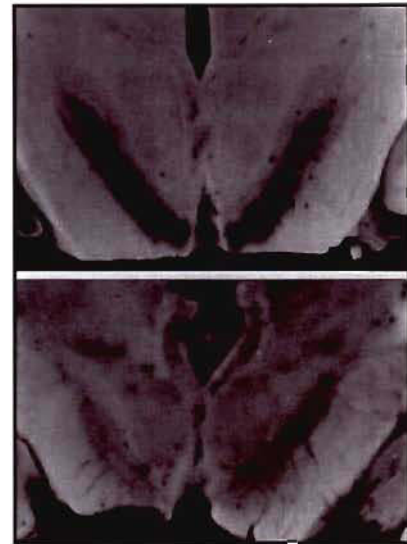


FIGURE 1.18 Pigmentation neuromélanique du cerveau normal (haut) et du cerveau Parkinsonien (bas) [187]

Cette destruction massive au niveau des neurones DAergiques provoque ainsi une diminution de l'innervation DAergiques au niveau du striatum (voir figure 1.17 et 1.18). Le contrôle moteur en est donc altéré, ce qui conduit aux troubles locomoteurs associés à la MP.

1.2.3.3 Présence de CL dans la MP

Un CL est une agrégation protéique anormale, éosinophile et sphérique, qui se développe à l'intérieur des cellules neuronales (voir figure 1.19) [165]. Ces inclusions ont été décrites pour la première fois en 1912 par Friedrich Heinrich Lewy, un éminent neuroanatomiste et psychiatre allemand [188]. Il est maintenant connu que les CL sont formés des protéines alpha-synucléine associées avec l'ubiquitine, la parkine et les neurofilaments [165, 189].

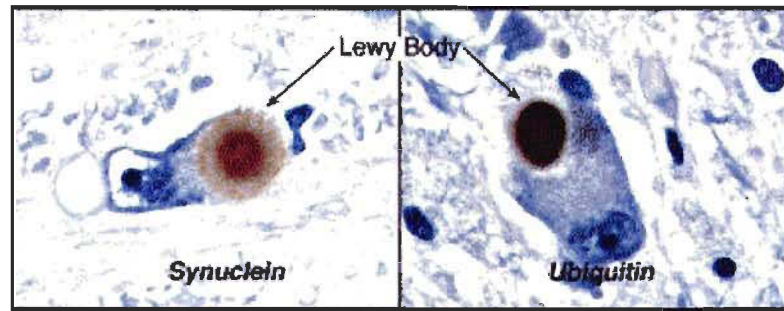


FIGURE 1.19 Corps de Lewy [165]

À l'autopsie, pratiquement tous les parkinsoniens présentent des CL [190]. Cependant, il a été démontré que 10-15 % des gens de plus de 65 ans démontraient une présence de CL sans présenter de maladies neurologiques [162]. Ainsi, tous les CL ne sont pas nécessairement associés avec la MP. De plus, il n'est pas encore connu à savoir si les CL représentent la cause ou une conséquence de la MP. Une étude a démontré qu'une mutation génétique au niveau de la protéine alpha-synucléine pourrait prédisposer à la formation et l'accumulation des CL. Le lien entre les mutations protéiques et la MP sera rediscuté dans la section 1.3.1.

1.3 L'étiologie de la MP

Qui aurait pu prédire qu'une pathologie caractérisée depuis 1817 pourrait être encore si peu connue? La cause initiale de la MP demeure toujours pour une grande majorité totalement idiopathique. En effet, la maladie serait de cause génétique pour seulement 5 % des cas [165]. Ainsi, si les mécanismes de la mort neuronale commencent à être élucidés, ses causes restent hypothétiques. Malgré tout, plusieurs possibilités sont évoquées pour expliquer cette destruction DAergique : des facteurs génétiques et toxiques, le phénomène de stress oxydant ainsi que l'inflammation [165]. En fait, tous ces facteurs restent intimement liés : les facteurs génétiques et toxiques prédisposent à la maladie, les facteurs toxiques provoquent l'implantation d'une neuroinflammation, et cette dernière induit un état de stress oxydant chez les cellules avoisinantes [5] (voir figure 1.20).

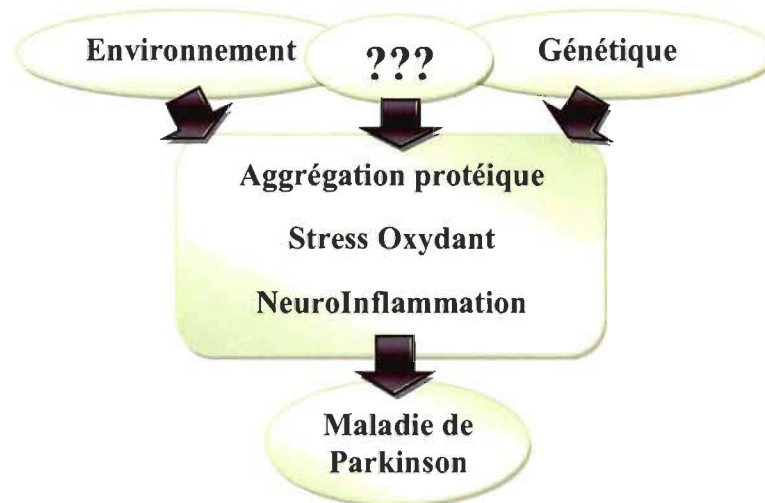


FIGURE 1.20 Étiologie de la MP

1.3.1 La MP héréditaire

Une étude publiée en 1999 par Tanner et al. sur un grand nombre de jumeaux suggère une composante génétique dans les cas de la MP précoce et donc se déclarant avant 50 ans [191]. Jusqu'à maintenant, les chercheurs en neurosciences ont réussi à identifier six gènes qui pourraient avoir un impact sur la prédisposition à développer la MP.

PARK1 : L' α -synucléine

L' α -synucléine est le premier gène mutant impliqué dans la MP. Il a été décrit en 1996 grâce à une étude sur une famille italienne qui présentait un parkinsonisme familial [192]. Ainsi, deux mutations de ce gène furent identifiées au niveau 4q21. L' α -synucléine normale est retrouvée en abondance dans le tissu cérébral. Elle semble être impliquée au niveau de la plasticité neuronale et du dynamisme membranaire neuronal [165, 193]. Par ailleurs, l' α -synucléine mutante est l'une des constituantes majeures des corps de Lewy [193]. En effet, ses mutations augmentent la propension des protéines à prendre une forme bêta plissée *in vitro* [194], ce qui semble favoriser la formation des CL. La mutation amène ainsi un gain de toxicité à la protéine dont les conformations insolubles tendent à s'accumuler au sein de la cellule.

Forloni et son équipe ont démontré qu'un peptide de l' α -synucléine agrégée provoquait une neurotoxicité importante au niveau des neurones DAergiques, démontrant ainsi son implication dans la pathogenèse de la MP [195]. Il est important de mentionner qu'aucune mutation de l' α -synucléine n'est retrouvée au niveau de la MP idiopathique [194].

PARK2 : La parkine

Découverte en 1998 au Japon, la parkine est une protéine de 465 aminoacides dont le gène est localisé dans la région 6q25. Une mutation dans ce gène a démontré une grande implication dans les formes familiales récessives de la MP [196]. En fait, il semblerait qu'une telle mutation soit la cause de 50 % des formes juvéniles de la MP [196]. À l'état normal, la parkine a une activité ubiquitine ligase E3 qui participe à la dégradation de diverses protéines par le système ubiquitine-protéasome. Les mutations provoquent donc une perte de fonction de la parkine, ce qui peut entraîner l'accumulation des substrats et potentiellement endommager les cellules [165].

PARK5 : Ubiquitine C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1)

L'UCH-L1 est une protéine de 223 aminoacides. Une mutation a été décrite en 1998 et semble être responsable d'un parkinsonisme autosomique dominant dopa-sensible [197]. UCH-L1 fait partie d'une famille de protéines qui hydrolysent les extrémités C terminales des molécules d'ubiquitine, afin d'en permettre le recyclage. *In vitro*, la forme mutée I93M de l'UCH-L1 a une activité enzymatique réduite, ce qui entrave la voie ubiquitine-protéasome. Cette caractéristique explique son implication dans la MP [198].

PARK6 : PINK-1

Retrouvé au niveau 1p35-36, le gène PINK-1 code pour la protéine kinase 1 induite par la « phosphatase and tensin homolog ». Cet enzyme se retrouve dans la mitochondrie et semble jouer un rôle protecteur en cas de stress. Une mutation dans cette enzyme provoque donc une vulnérabilité au stress chez les mitochondries [199]. Une étude a démontré le lien moléculaire entre la mutation de cette protéine et la pathogenèse de la MP [199].

PARK7 : La DJ-1

La protéine DJ-1 est codée par un gène retrouvé dans la région 1p36. Elle est ubiquitaire et hautement exprimée dans le cerveau [200]. L'exacte fonction de cette protéine de 189 aminoacides demeure toutefois toujours inconnue [199, 200]. Certains arguments suggèrent une implication dans les mécanismes de défense cellulaire contre le stress oxydant. En effet, une déficience quantitative en DJ-1 provoque une haute sensibilité au stress occasionné par le H₂O₂ [201]. Ainsi, par l'étude de deux familles prises avec un parkinsonisme autosomique récessif, Bonifati et son équipe ont mis en évidence qu'une délétion et une mutation ponctuelle de la DJ-1 avaient un rôle à jouer dans la MP [200].

PARK8 : La dardarine

Finalement, la dardarine est une protéine codée par le gène « Leucine-rich repeat kinase 2 », celui-ci est retrouvé sur le chromosome 12 [202]. Les fonctions exactes de cette protéine demeurent toujours un mystère. Toutefois, il est connu que c'est une protéine kinase. Des mutations au niveau du gène « Leucine-rich repeat kinase 2 » ont été associées avec la pathogenèse de MP familiales et idiopathiques [202, 203].

1.3.2 Les facteurs toxiques et la MP

Malgré les récentes découvertes au sujet des protéines et gènes mutants impliqués dans la MP, il n'en demeure pas moins que 95 % des malades demeurent idiopathiques. À ce sujet, plusieurs chercheurs optent pour l'hypothèse selon laquelle la MP résulterait de l'exposition de l'individu à des toxines spécifiques aux neurones DAergiques. Plusieurs études ont ainsi démontré l'effet délétère de plusieurs composés au niveau du SNC, et plus particulièrement au niveau du système DAergique.

Une exposition aiguë à certains métaux pourrait provoquer des symptômes parkinsoniens [158]. Par exemple, une exposition professionnelle au plomb, au cuivre, au fer et au manganèse a été associée à une augmentation du risque de développer un syndrome parkinsonien [204-206]. Par contre, aucune étude n'a pu mettre en évidence une relation directe entre la MP et l'exposition aux métaux [158].

Le méthyl-4-phényl-1-2-3-6-tétrahydropyridine (MPTP) occupe quant à lui une position bien à part. En effet, le MPTP est une substance découverte en 1982, lorsque de jeunes toxicomanes californiens se sont injectés un agent hallucinogène de leur fabrication : du 1-méthyl-4-phényl-4-propionoxypiperidine, un analogue du narcotique Demerol. Le problème, c'est que cette préparation était malheureusement contaminée de MPTP. Les jeunes ont ainsi développé un sévère et irréversible syndrome parkinsonien quelques jours après l'injection. Ces symptômes étaient corrigés par la L-dopa et l'étude anatomopathologique *post-mortem* a révélé une atteinte quasi exclusive de la SNpc [207]. Cette étude a permis depuis d'obtenir de nombreux modèles *in vivo* et *in vitro* de la MP et ceux-ci seront discutés en profondeur dans la section 1.3.4.1.

Le MPTP ressemble beaucoup structurellement au PQ, un pesticide largement utilisé à travers le monde (voir section 1.3.4.1). Dans la même lignée, la roténone, un autre pesticide, est également utilisée comme modèle expérimental de la MP. Toutes ces substances toxiques contribuent à soutenir l'hypothèse d'une étiologie toxique. D'ailleurs, il a été démontré qu'il existait une association entre le milieu rural, la

consommation d'eau de puits et l'exposition aux pesticides [158]. De nombreuses études ont démontré une augmentation dans la prévalence de la MP chez les gens qui habitent dans des secteurs fortement agricoles avec une forte exposition aux pesticides.

Toutefois, toutes ces allégations restent hypothétiques puisqu'aucun foyer localisé pouvant être considéré à risque n'a jamais été décelé [158].

1.3.3 Le stress oxydant et la MP

C'est l'hypothèse du stress oxydant qui, actuellement, explique le mieux la mortalité neuronale DAergique. Cet état représente la conséquence du déséquilibre entre la production de radicaux libres (RL) et la capacité du système de défense antioxydante de la cellule (voir figure 1.21). Les RL sont un produit normal du métabolisme cellulaire. Par contre, la surproduction de ces molécules affecte l'intégrité de la cellule, et peut enclencher le processus d'apoptose, une mort cellulaire programmée. Pour lutter contre ces RL, la cellule dispose de plusieurs ressources telles que l'enzyme antioxydante superoxide dismutase pour éliminer l' O_2^{\bullet} et la catalase pour la transformation des H_2O_2 en eau [208].

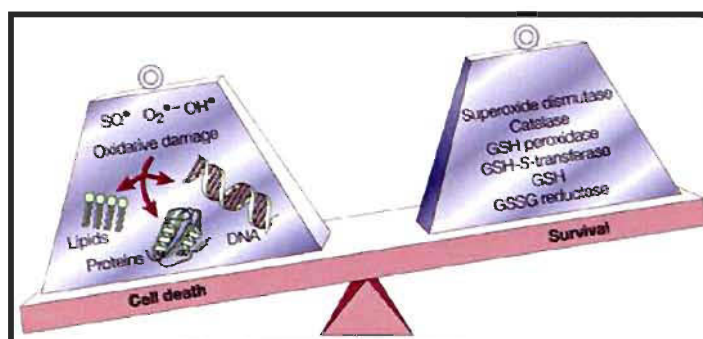


FIGURE 1.21 Le stress oxydant : un état de déséquilibre [209]

Le cerveau est un organe extrêmement sensible. Bien qu'il ne compte que pour 2-3 % de la masse totale du corps humain, il consomme jusqu'à 20 % de l'oxygène total de l'organisme [210]. De plus, les cellules du cerveau sont particulièrement sensibles au stress oxydant vu leur concentration élevée en acide gras polyinsaturés au niveau de leur

membrane et vu leur faible activité endogène antioxydante [210]. Au cours de sa synthèse et de sa dégradation, le métabolisme de la DA produit beaucoup de molécules reconnues comme source endogène toxique provoquant un stress oxydant sur l'environnement avoisinant [211]. Cet état constitutionnel explique en quoi les neurones de la SNpc sont les cellules les plus exposées à des quantités élevées de RL et ainsi les plus vulnérables. Ainsi, il a été démontré à maintes reprises que le stress oxydant avait un rôle majeur dans la neurodégénérescence sélective DAergiques de la MP [212].

1.3.4 La neuroinflammation et la MP

Le stress oxydant induisant la mort des cellules DAergiques au sein de la MP peut aussi être induit par un processus de neuroinflammation (voir figure 1.22). Comme mentionnée précédemment, l'inflammation chronique au niveau du SNC provoque des conséquences particulièrement dommageables pour les neurones. En effet, depuis une vingtaine d'années, la neuroinflammation est suspectée d'être la cause principale de la MP [210, 213].

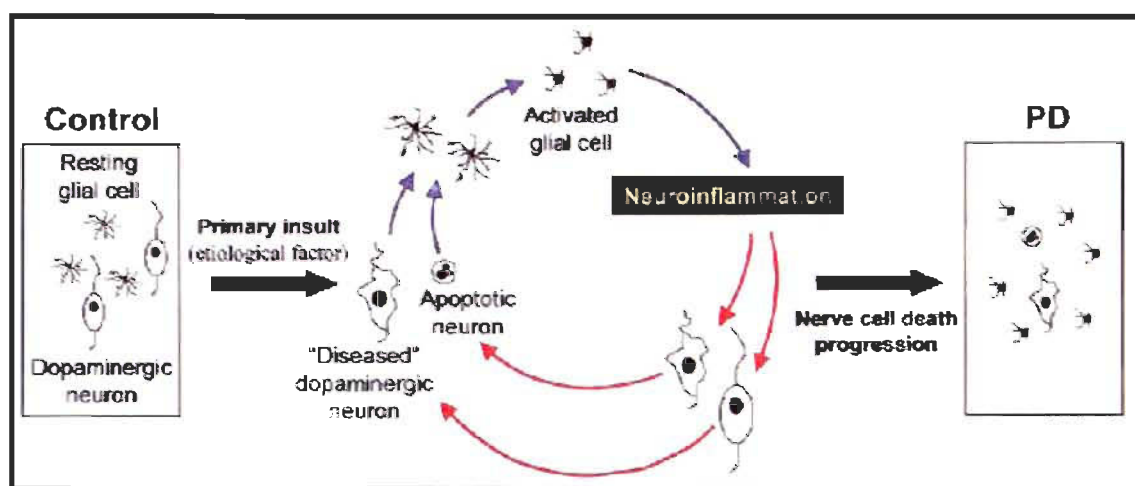


FIGURE 1.22 Le rôle de la neuroinflammation dans la MP [214]

La première évidence date de 1988. L'équipe de McGeer a rapporté une augmentation importante du nombre de cellules microgliales activées dans la SNpc de patients parkinsoniens [4]. Ces données suggéraient un rôle important pour ces cellules dans la mortalité des neurones. Cette hypothèse neuroinflammatoire fut confirmée quelques années plus tard avec les travaux de Mogi et son équipe. Pour la première fois,

une augmentation du niveau de cytokines pro-inflammatoires était démontrée chez les gens parkinsoniens [95]. D'ailleurs, avec l'âge, la réponse microgliale devient plus robuste [215] et la présence de cytokines pro-inflammatoires au sein du cerveau sain augmente [216], corrélant avec l'âge moyen avancé de la maladie. Une étude a même démontré que les parkinsoniens présentaient une concentration de microglie six fois supérieure à celle d'une personne normale [4]. Ainsi, l'effet cytotoxique des dérivés de la cellule microgliale activée fut démontré à maintes reprises. Par exemple, plusieurs études ont démontré que l'inhibition pharmacologique de l'enzyme iNOS atténuait la mort neuronale DAergique *in vivo* et *in vitro* [217, 218].

Par ailleurs, une grande étude clinique a prouvé le rôle de la neuroinflammation dans la pathogenèse de la MP en démontrant une diminution de la prévalence de la maladie chez les gens utilisant des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) de façon régulière [219]. Au niveau *in vitro*, il a aussi été démontré que l'administration d'AINS diminue le niveau de neurodégénération DAergique dans plusieurs modèles de la MP [220-222].

Finalement, au niveau d'étude *in vivo*, il fut démontré qu'un inhibiteur sélectif de l'activation microgliale, la minocycline, diminuait de manière significative la mortalité DAergiques dans des modèles de souris parkinsoniennes [223, 224].

Ainsi, même si tout indique que la neuroinflammation occupe un grand rôle dans la MP, nos connaissances restent limitées. Par exemple, la question demeure toujours à savoir si l'activation de la microglie provoque ou aggrave la maladie [6]. Toutefois, plusieurs laboratoires cliniques ont rapporté qu'il serait possible de développer une thérapie de vaccination ou pharmacologique afin de contrôler les réponses immunitaires du cerveau [24].

1.3.4.1 Les modèles pour l'étude de la neuroinflammation dans la MP

Afin d'étudier les processus neuroinflammatoires au sein de la MP, il fut nécessaire de créer des modèles *in vivo* et *in vitro* reproduisant le plus fidèlement possibles les manifestations retrouvées chez l'humain. Depuis quelques années, trois toxines sont fortement utilisées dans ce but : il s'agit du MPTP, du PQ et du LPS.

Le MPP⁺ / MPTP

Comme discuté à la section 1.3.2, le MPTP fut découvert lorsque de jeunes toxicomanes s'injectèrent une préparation contaminée de MPTP. Ils développèrent ainsi un syndrome parkinsonien irréversible [207]. La nature des symptômes des jeunes toxicomanes éveilla la curiosité des chercheurs et le mécanisme d'action du MPTP fut rapidement élucidé.

D'abord, cette molécule est hautement lipophile et traverse aisément la BHE pour se rendre au SNC [225]. À ce niveau, elle est convertie en son métabolite actif, le 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) par la monoamine-oxydase B (MAO)-B contenue dans les astrocytes. C'est actuellement le MPP⁺ qui est reconnu comme néfaste et neurotoxique pour le SNC (voir figure 1.23).

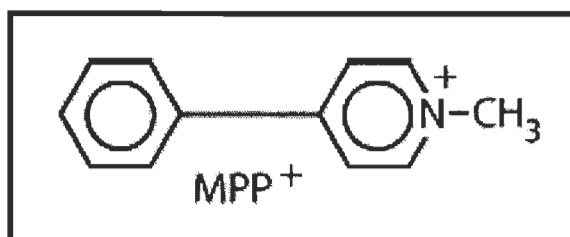


FIGURE 1.23 Structure du MPP⁺ [165]

D'une part, le MPP⁺ entre spécifiquement dans les neurones DAergiques grâce à sa grande affinité pour le DAT (voir figure 1.24).

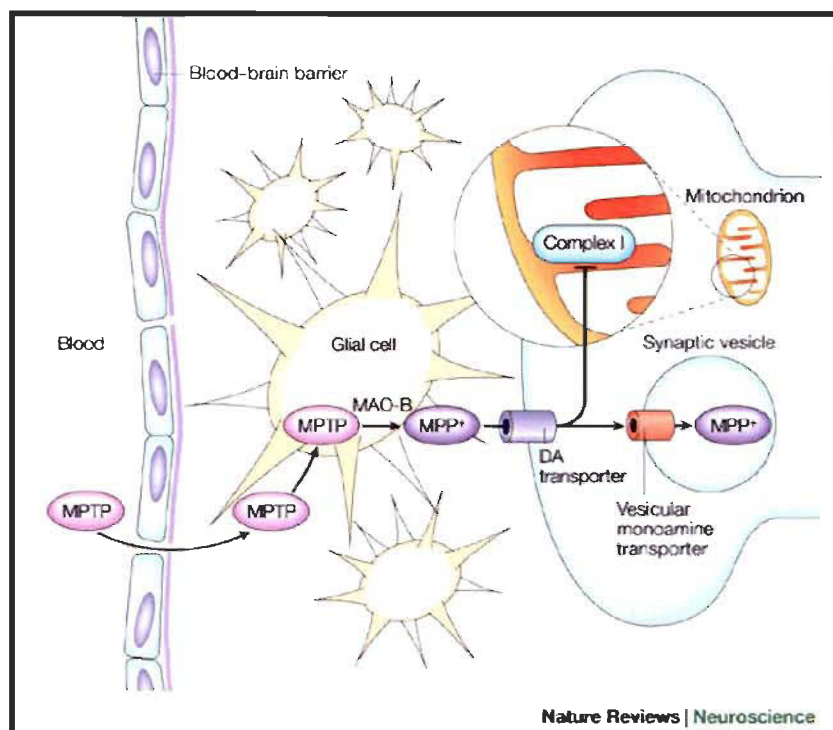


FIGURE 1.24 Les mécanismes d'action du MPTP/MPP+ [226]

À l'intérieur des neurones, le MPP+ est reconnu pour induire une neurotoxicité de deux façons. Premièrement, il peut rester dans le cytosol et interagir avec les protéines présentes et plus particulièrement celles chargées négativement [227]. Deuxièmement, le MPP+ peut inhiber le complexe I de la chaîne de transport des électrons de la membrane mitochondriale. Cette interférence dans la respiration mitochondriale aura pour effet une grande production de RL, laquelle est en partie responsables des processus de mort neuronale apoptotiques enclenchés [228]. Ainsi, le MPTP administré chez les humains, les primates et les souris provoque un robuste et irréversible syndrome parkinsonien [229].

D'autre part, une étude a démontré une activation microgliale importante, signe de neuroinflammation, chez les patients exposés au MPTP [62]. De plus, Langston et son équipe ont démontré que même une année entière après l'injection de MPTP chez les patients parkinsoniens, la forte activation microgliale était toujours présente. Ces résultats suggèrent une implication pour ces cellules dans la neurotoxicité du MPTP/MPP+ [62]. Par la suite, l'équipe de Barcia a prouvé que la neurodégénérescence à long terme était associée avec l'activation microgliale [230]. Cette affirmation a été

confirmée par une étude qui a démontré que lorsque des cellules microgliales étaient ajoutées aux cultures neuronales, la neurotoxicité du MPTP était grandement augmentée [231]. Toutefois, l'effet direct du MPP⁺ au niveau des cellules microgliales n'est pas encore connu.

Ainsi, le MPP⁺ est une neurotoxine fortement associée avec la MP et il induit ses effets néfastes en partie grâce à la neuroinflammation qu'il provoque.

Le PQ

Le PQ est un herbicide puissant et non sélectif, utilisé depuis 1961 dans plus de 120 pays (voir figure 1.25). C'est en 1980 qu'il fut avancé pour la première fois que le PQ pouvait être néfaste pour l'homme, particulièrement au niveau du SNC. Depuis, l'Union européenne et plusieurs autres pays tels que l'Australie, la Suisse et la Russie ont interdit l'utilisation de ce produit [232].



FIGURE 1.25 Le PQ comme herbicide

Comme mentionné à la section 1.3.2, le PQ présente une structure très semblable au MPP⁺ (voir figure 1.26). Toutefois, il ne passe pas la BHE de manière spontanée comme le MPTP. En fait, il nécessite l'assistance du « L-neutral amino acid transport » [233]. Au niveau du SNC, il semblerait que le PQ exerce sa toxicité via l'implication des ROS [234, 235]. D'ailleurs, ce mécanisme pourrait expliquer la sélectivité du PQ envers les neurones DAergiques puisque ceux-ci sont plus vulnérables au stress oxydant (voir section 1.3.3).

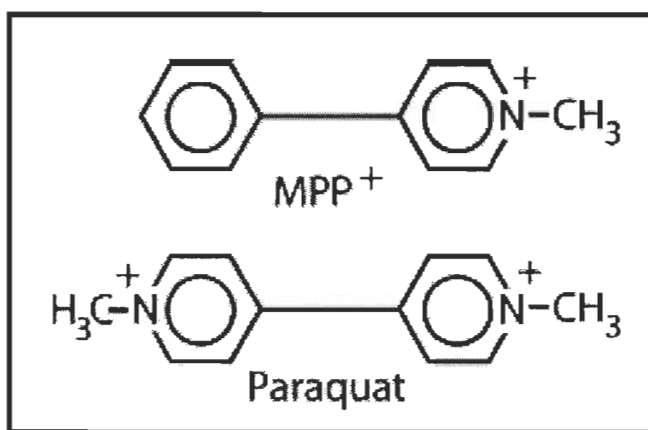


FIGURE 1.26 Structures du MPP⁺ et du PQ [165]

D'une part, de nombreuses études épidémiologiques ont démontré le lien évident entre l'exposition aux pesticides et le risque de développer la MP [236, 237]. Une étude a ainsi prouvé le risque d'une exposition au PQ en démontrant la relation dose dépendante avec la MP. À Taiwan, où le PQ est largement utilisé dans les champs de riz, le ratio de Parkinsonien est 6,4 fois plus élevé chez les gens ayant été exposés au PQ pendant plus de 20 ans [236]. De plus, ces résultats ont été reproduits *in vivo* par des injections intrapéritonéales de PQ chez des souris. Cette étude a aussi démontré que la neurotoxicité était sélective au niveau de la SNpc [238]. Ainsi, le PQ, tel que retrouvé dans la MP, induit une neurodégénérescence DAergique sélective.

D'autre part, Liou et son équipe ont démontré la présence d'une forte activation microgliale suite à une injection intracérébrale de PQ chez des rats [63]. Cette caractéristique fut confirmée par des analyses *post-mortem* chez plusieurs patients décédés d'un empoisonnement fatal au PQ [239]. En 2005, le laboratoire de Wu a démontré le rôle important de la cellule microgliale dans la neurotoxicité du PQ [240]. En effet, une faible dose de PQ a provoqué une toxicité sélective uniquement dans les cultures contenant des cellules microgliales. De plus, les souris déficientes au NOX microglial soumises au PQ n'ont pas présenté de neurotoxicité. Ainsi, il semblerait que la neurotoxicité sélective DAergique passerait par l'induction du NOX microglial [240]. Toutefois, le mécanisme par lequel agit le PQ sur la cellule microgliale est toujours un mystère.

Le PQ est donc une neurotoxine sélective associée à la MP qui induit sa toxicité par une implication obligatoire des cellules microgliales et donc de la neuroinflammation.

Le LPS

Le LPS est une endotoxine de la membrane des bactéries Gram négative (voir figure 1.27). Cette molécule assure l'intégrité de la membrane bactérienne et protège la bactérie des attaques externes. Le LPS est responsable de l'induction inflammatoire lors d'infection bactérienne. Il est l'un des plus puissants activateurs de la cellule microgliale [241]. D'ailleurs, son mécanisme d'activation est bien connu. D'abord, il se lie avec la LPS-binding protéine. Le complexe LPS/LPS-binding protéine peut ensuite aller se fixer au récepteur hétérodimère CD14-TLR4 et avec une autre protéine, la « myeloid differentiation protein-2 » (MD-2) [242, 243]. La signalisation intracellulaire qui suit la création du complexe CD14/TLR4/MD-2 – LPS/LPS-binding protéine mène à une robuste production de cytokines inflammatoires telles qu'IL-6, IL-1 et TNF et aussi de chémokines telles qu'IL-8/CXCL8. Comme la plupart des TLR, cette production de cytokine semble passer par l'activation du facteur NF- κ B (voir figure 1.28) [70].

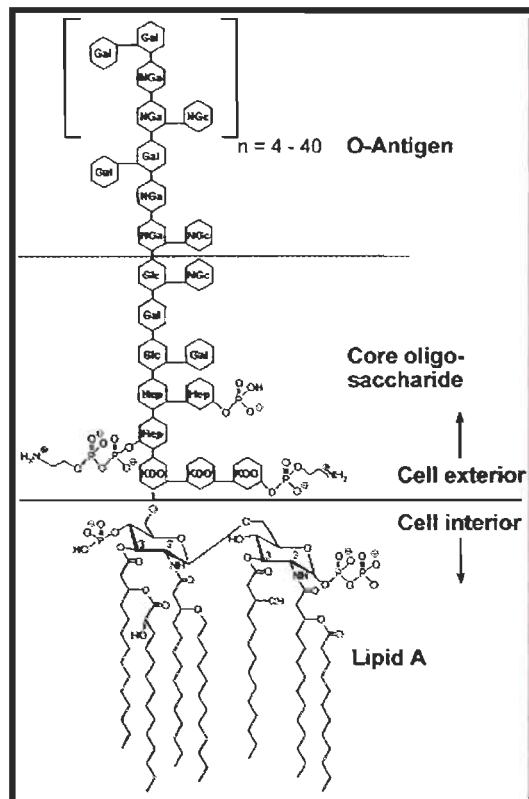


FIGURE 1.27 Structure du LPS

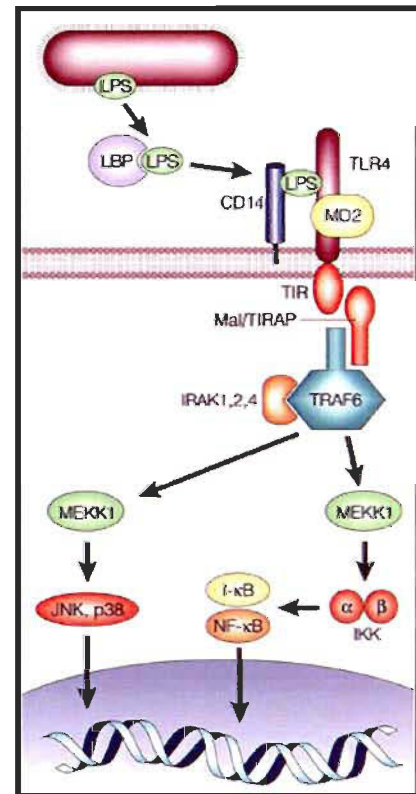


FIGURE 1.28 Signalisation intracellulaire induite par le LPS [1]

Ensuite, il a été démontré à maintes reprises qu'une injection de LPS au niveau de la SN de rats provoque une robuste activation microgiale menant à la neurodégénérescence DAergique [64, 244, 245]. Cette affirmation a été confirmée par des études *in vitro* [246]. Par ailleurs, il a été démontré que cette neurodégénérescence DAergique était médiée par l'activation microgiale avec une subséquente production de facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β [247], le TNF- α [248], l'IL-6 [249], et le NO [250].

Ainsi, le LPS est une toxine neurotoxique pour les neurones DAergiques via un mécanisme impliquant une induction inflammatoire par l'activation microgiale et le subséquent état de stress oxydant provoqué dans le microenvironnement adjacent.

1.4 Les traitements de la MP

Il n'existe pas de traitement curatif de la maladie. Les possibles thérapies ont donc pour but de corriger les symptômes du patient, principalement les symptômes moteurs. Le but de la thérapie sera donc de soulager le plus de symptômes chez le parkinsonien, mais aussi le plus longtemps possible. Malgré tout, la MP est à l'avant-garde des neurosciences : neurochirurgie fonctionnelle et encore plus visionnaire, greffe neuronale. Les parkinsoniens peuvent donc bénéficier de ces avancées remarquables en attendant que la recherche perce le mystère de l'origine de la maladie.

1.4.1 Traitements médicamenteux de la MP

Exclusivement symptomatique, la médication fera appel à différents mécanismes destinés à accroître la quantité de DA dans le cerveau ou encore de réduire l'hyperactivité cholinergique.

1.4.1.1 La dopathérapie

Le premier but d'une thérapie sera de pallier le déficit en DA provoqué par la mort des neurones. Ainsi, l'administration de L-dopa, le précurseur de la DA, allège la plupart des symptômes. Pourquoi ne pas administrer directement des doses de DA? Parce que la L-dopa peut traverser la BHE, contrairement à la DA.

La L-dopa

Ainsi, comme démontré à la figure 1.29, la dopamine est un maillon de la chaîne de synthèse de l'épinéphrine. D'abord, la tyrosine hydroxylase transforme la L-tyrosine en L-Dopa. Cet enzyme travaille au maximum de ses capacités c'est-à-dire qu'un apport supplémentaire en tyrosine n'augmentera pas la L-dopa.

Ensuite, la dopa-décarboxylase (DDC) va transformer en DA la L-dopa disponible. La DDC est retrouvée de manière ubiquitaire dans l'organisme humain. Ainsi, la L-dopa administrée chez les patients sera presque toute absorbée et transformée dès son entrée dans le système digestif, ne laissant qu'environ 1 % gagner le cerveau. Ceci explique en grande partie les difficultés qu'ont rencontrées les chercheurs dans la mise au point d'un tel médicament. En effet, ils ont mis sept ans à élaborer un plan d'action efficace, après la découverte du manque flagrant de DA dans la MP. Ainsi, aujourd'hui, la L-dopa est toujours administrée en combiné avec un inhibiteur de la DDC périphérique (IDDC). L'adjonction de cet inhibiteur permet donc l'économie de 80 % de L-Dopa. De plus, cet IDDC ne passe pas la BHE. À ce niveau, les DDC peuvent donc effectuer leur travail et soulager les patients.

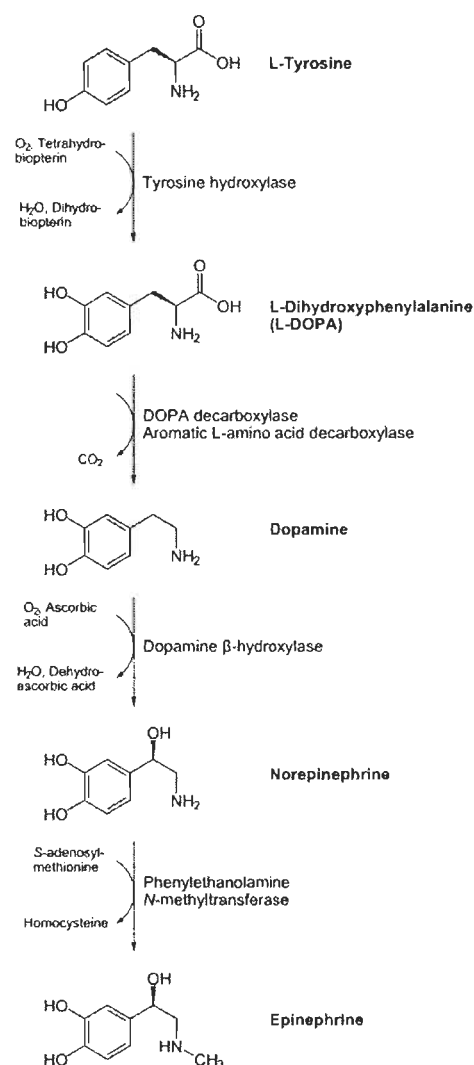


FIGURE 1.29 Synthèse des catécholamines

Cette thérapie possède cependant de sérieux inconvénients. D'abord, à mesure que la maladie progresse, la dégénérescence neuronale se poursuit. Ainsi, les doses nécessaires de L-Dopa augmentent jusqu'à une valeur plateau. De plus, cette thérapie procure beaucoup d'effets secondaires indésirables, comme les dyskinésies [165]. En effet, au début de cette thérapie, l'effet bénéfique semble constant. Toutefois, après quelques années de prise de L-Dopa s'installe les complications motrices nommées période ON/OFF. Ainsi, au cours des journées, des périodes d'amélioration et des périodes de résurgence des symptômes se succèdent. Après quelques années de traitement, ces fluctuations s'amplifient et certaines phases deviennent invalidantes. Cette durée d'action courte de la dopathérapie est un inconvénient majeur du traitement.

Les médicaments d'appoint

Les médicaments d'appoint possèdent une activité mineure comparée à celle de la L-dopa. Ils présentent quand même de nombreux avantages. En effet, la DA peut être dégradée par deux enzymes, la MAO et la catéchol-o-méthyltransférase. Les inhibiteurs de MAO en association à la dopathérapie permettent d'augmenter l'effet de 20 à 30 %. Pour leur part, les inhibiteurs de la catéchol-o-méthyltransférase toujours associés à la L-dopa vont prolonger l'action de cette dernière sans en majorer le pic de concentration sanguine.

1.4.1.2 Les agonistes DAergiques

Une alternative de la dopathérapie est une thérapie par les agonistes DAergiques. En effet, ces médicaments miment l'action de la DA avec beaucoup d'avantages sur celle-ci. Ils ne nécessitent pas la présence de neurones contenant de la DA, ni la conversion de L-Dopa en DA. De plus, ils ont une longue durée d'action et peuvent être spécifiques d'un type de récepteurs DAergiques. Toutefois, ces agonistes ne peuvent pas remplacer la dopathérapie. En effet, administré seul, leur efficacité reste modérée et s'estompe après quelques mois ou années. De plus, plusieurs effets indésirables s'ajoutent à la liste déjà longue : troubles psychiques, somnolence diurne, nausée et vomissement [162, 166].

Par ailleurs, l'apomorphine est aujourd'hui très offerte aux patients présentant des phases « OFF » très invalidantes. Dérivée de la morphine, l'apomorphine a perdu toutes ses propriétés de stupéfiant, la rendant comme une sœur jumelle de la DA. Totalement absorbée au niveau du foie lorsqu'administrée par voie orale, l'apomorphine est injectée de manière sous-cutanée et procure un effet dans les 10 à 15 minutes suivantes. Malheureusement, ce médicament n'améliore en rien la réponse motrice et ne constitue qu'une option « d'urgence » lors d'une phase « OFF » très invalidante.

1.4.1.3 Les anticholinergiques

Introduits par Charcot en 1869, les anticholinergiques ont représenté les seuls médicaments offerts aux parkinsoniens pendant plus d'un siècle. Comme le nom l'indique, les anticholinergiques s'opposent à la neurotransmission de l'acétylcholine. Un déséquilibre entre l'activité cholinergique et l'activité DAergique a été démontré au niveau de la MP. En effet, la perte de neurones DAergiques provoque une désinhibition des neurones cholinergiques, ce qui occasionne une grande contraction musculaire. Ainsi, un traitement avec des anticholinergiques diminue l'activité cholinergique en antagonisant ses neurones. Il a été démontré que ce type de traitement soulage les patients parkinsoniens et plus particulièrement ceux avec un tremblement important.

1.4.2 Traitements chirurgicaux de la MP

Depuis la fin des années 1980, le traitement neurochirurgical pour la MP a fait un retour en force. Le principe général des chirurgies consiste à bloquer une des structures du circuit nigro-strio-pallido-thalamique dont l'hyperactivité est responsable de la symptomatologie. Ce blocage peut être effectué par destruction (pallidotomie et thalamotomie) ou par stimulation à haute fréquence (Stimulation cérébrale profonde [SCP]).

1.4.2.1 La pallidectomie et la thalamotomie

Bien avant que des traitements médicamenteux soient disponibles, les neurologues s'étaient rendu compte que lorsqu'un parkinsonien subissait une attaque ischémique cérébrale, il voyait ses symptômes associés à la MP diminuer. Cela signifiait qu'une lésion au niveau des structures motrices permettait l'amélioration de certains symptômes parkinsoniens! C'est ainsi qu'en 1960, l'équipe du Dr. Cooper a découvert qu'avec la destruction du noyau ventral intermédiaire du thalamus (VIT) ou thalamotomie, le tremblement était supprimé huit fois sur dix, la rigidité et la douleur étaient souvent

améliorées. Toutefois, il persiste beaucoup d'effets indésirables tels que des troubles d'équilibres, des déficits moteurs et un affaissement intellectuel important.

La pallidectomie, quant à elle, consiste en la destruction chirurgicale d'une partie du GP. Elle améliore la rigidité musculaire, les dyskinésies ainsi que les tremblements reliés à la MP. Elle est d'abord pratiquée unilatéralement, quoique plus ou moins efficace. Il faut parfois la renouveler si les symptômes réapparaissent, ou encore la réaliser de manière bilatérale. Malgré l'efficacité augmentée de la pallidectomie bilatérale, ces effets secondaires sont graves et définitifs. Ainsi, cette technique n'est pratiquement plus employée en raison des possibles effets secondaires associés.

1.4.2.2 La SCP

En 1987, le professeur Benabid avait constaté que la stimulation électrique modifiait le tremblement : une stimulation à basse fréquence l'aggravait alors qu'une stimulation à haute fréquence le diminuait ou l'abolissait complètement [251]. C'est ainsi que la SCP a supplanté la thalamotomie et la pallidectomie au cours des dernières années, vu la diminution marquée des effets indésirables et vu son potentiel réversible [167]. Cette chirurgie consiste en l'implantation de minuscules électrodes dans une zone précise du cerveau. Cette électrode est reliée à un stimulateur externe : un petit boîtier électronique implanté en région sous-claviculaire (voir figure 1.30).

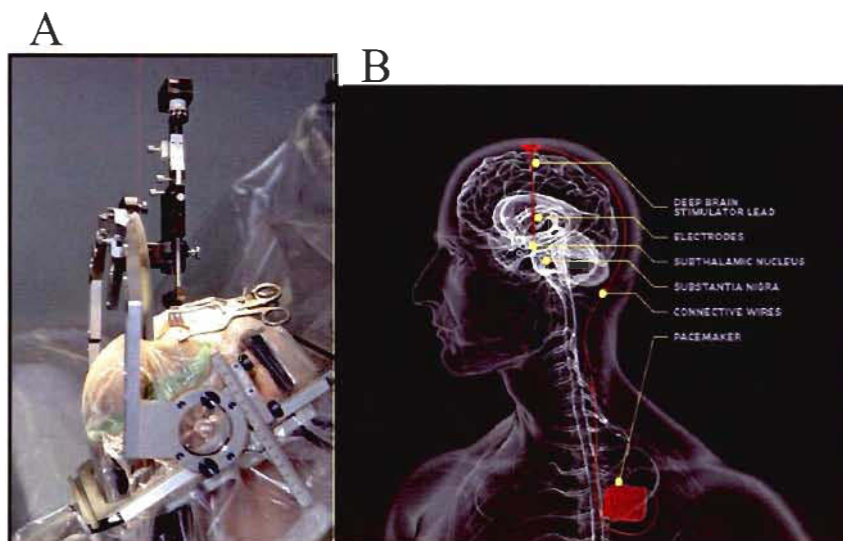


FIGURE 1.30 (A) Un patient subissant la SCP **(B)** Schéma illustrant la SCP

La chirurgie mime ainsi l'effet d'une lésion et a donc une action inhibitrice sur les neurones, variable selon sa cible neuronale. Diverses cibles ont donc été définies selon les symptômes : le VIT, le GPm ou le NST. La stimulation du NST est privilégiée par sa capacité à agir sur un grand nombre de symptômes (voir figure 1.31).

Symptômes	VIT	GPm	NST
Tremblement	+++	++	+++
Rigidité	+	++	++
Akinésie	0	±	±+
Dystonie « OFF »	0	++	+++
Dyskinésies	++	+++	+++

FIGURE 1.31 Choix des cibles chirurgicales selon les symptômes [167]

Cette chirurgie sera surtout proposée aux malades ayant des fluctuations motrices très invalidantes, mais qui conservent une bonne dopa-sensibilité. L'avantage de cette technique réside en l'ajustement possible au niveau de la fréquence, de la longueur et de la puissance des stimulations pour un effet bénéfique optimal.

1.4.2.3 Greffe neuronale

Encore au stade d'expérimentation, la greffe neuronale sera bientôt offerte comme thérapie. Elle consiste en l'implantation intracérébrale de tissu fœtal pour remplacer les neurones DAergiques atteints. Toutefois, plusieurs problèmes demeurent à résoudre avec cette chirurgie, aussi éthiques que techniques.

1.4.3 Les thérapies préventives de la MP

Le geste à poser afin de promouvoir notre santé personnelle demeure la saine alimentation. D'ailleurs, il devient de plus en plus à la mode de consommer des « aliments-médicaments » qui nous amènent plusieurs effets bénéfiques. À ce titre, le Dr. Richard Béliveau l'a bien compris en nous offrant son livre : « Les aliments anti-cancer ». En effet, il est très bien documenté que certains aliments de consommation quotidienne possèdent un potentiel antioxydant puissant. D'ailleurs à ce sujet, plusieurs études ont démontré que la capacité antioxydante de notre organisme proviendrait en grande majorité de notre alimentation. Mais qu'en est-il du potentiel anti-inflammatoire des aliments? Avec les maladies neurodégénératives présentant un profil inflammatoire important, il devient intéressant de s'attarder non plus seulement au potentiel antioxydant, mais aussi au potentiel anti-inflammatoire des aliments. Cette nouvelle voie nous permettra une thérapie préventive complète, basée sur l'alimentation.

C'est dans cette atmosphère de prise de conscience collective alimentaire que notre laboratoire s'est intéressé à certaines molécules naturelles dans un but de prévention de la neurodégénérescence DAergique dans la MP. Ainsi, mon projet de recherche s'est particulièrement porté sur l'étude de la quercétine et la sésamine, deux molécules naturelles au fort potentiel, faciles à ajouter à notre alimentation quotidienne.

1.5 La Quercétine

La quercétine est un polyphénol de la classe des flavonoïdes et de type flavonol (voir figure 1.32). Les flavonoïdes sont des composés naturellement présents de manière ubiquitaire chez les végétaux [252]. Ils ont été découverts et décrits pour la première fois en 1937 par Albert Szent-Gyorgyi (1893 - 1986) [253]. L'expression « nutriments semi-essentiels » est parfois employée pour désigner les flavonoïdes parce que, bien qu'on puisse survivre sans eux, ils sont nécessaires au maintien d'une bonne santé.

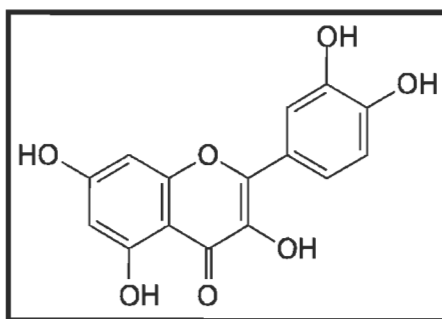


FIGURE 1.32 Structure de la quercétine

La quercétine est le plus actif des flavonoïdes et de nombreuses plantes médicinales lui doivent leur efficacité. En fait, il est maintenant reconnu que la quercétine possède une panoplie d'effets biologiques bénéfiques : potentiel anti-cancer [254-258], action antihistaminique [257, 259, 260], capacités antioxydantes [252, 261-264] et anti-inflammatoires [252, 265-273].

1.5.1 La biodisponibilité de la quercétine

On retrouve la quercétine dans une grande variété d'aliments incluant le thé, les oignons, les pommes, les brocolis ainsi que dans certaines graines et fruits oléagineux tels que les noix (voir figure 1.33).



FIGURE 1.33 Aliment contenant une grande quantité de quercétine

On estime que la consommation nord-américaine quotidienne en quercétine se situe autour de 25 mg, ce qui semble insuffisant pour en retirer les effets bénéfiques [274]. Ainsi, les concentrations plasmatiques normales se situent dans le nanomolaire. Une diète supplémentée en quercétine a démontré augmenté ces concentrations jusqu'au micromolaire [275]. En effet, il est estimé que pour une consommation quotidienne de 100 à 200 mg de quercétine, il y aura une concentration plasmatique maximale de 1,1 à 7,6 μM [276]. De plus, le caractère hydrophobie de la quercétine lui permet d'être distribuée dans tous les tissus. Par ailleurs, le temps de demi-vie de la quercétine plasmatique est d'environ 25 heures [277]. De plus, aucune accumulation de quercétine n'a été démontrée dans l'organisme ce qui prouve ainsi son caractère non-toxique [277].

1.5.2 La quercétine en tant qu'anti-cancer

Les propriétés anti-cancers de la quercétine ont été largement étudiées. Une grande étude impliquant 27 110 hommes fumeurs a démontré que l'ingestion quotidienne de flavonol était inversement proportionnelle au risque de développer un cancer des poumons [256]. De plus, une étude *in vitro* a révélé le caractère antiprolifératif de la quercétine au niveau des cellules cancéreuses du côlon [258]. Il semble que c'est par l'inhibition des voies de signalisation de la survie cellulaire PI3K-Akt/PKB que la quercétine produit son effet anti-cancer [255]. Il a aussi été démontré que la quercétine diminue l'expression de la protéine mutante p53 dans une lignée cellulaire de cancer du sein [254]. Finalement, un traitement avec 10 μM de quercétine chez des cellules de cancer du côlon en culture a inhibé l'expression de l'oncogène p21-ras [278]. La quercétine semble ainsi posséder des propriétés anti-cancers au niveau *in vivo* et *in vitro*.

1.5.3 L'activité antihistaminique de la quercétine

Les flavonoïdes sont reconnus pour leur action antihistaminique en diminuant la production d'histamine, une substance à l'origine des réactions allergiques [279]. Une étude réalisée au Japon a révélé que les personnes qui consommaient beaucoup de quercétine présentaient une diminution de 96 % dans leur production d'histamine [260].

Par ailleurs, il a été démontré que des inhalations de 10 mg de quercétine chez des cochons d'Inde diminuaient les symptômes liés à l'asthme par une diminution de la production d'histamine et du recrutement leucocytaire [259]. Cette étude a été confirmée par une grande étude épidémiologique menée en Finlande sur 10 054 sujets qui a montré un lien entre une diète riche en quercétine et un risque réduit d'asthme [257].

Ainsi, la quercétine semble diminuer les symptômes liés aux allergies et à l'asthme par une diminution de la production d'histamine et par une réduction de l'inflammation des voies respiratoires.

1.5.4 La quercétine comme antioxydante

Un grand nombre de preuves démontrent les propriétés antioxydantes de la quercétine. En fait, il semble que plusieurs des effets biologiques de la quercétine puissent être expliqués par son activité antioxydante. Des études ont révélé que la quercétine est la plus puissante des flavonoïdes en terme de stabilisatrice de RL et de ROS tels que le NO, le ONOO⁻ et le O₂⁻ [252]. Il semblerait que ce potentiel antioxydant soit dû au groupement catéchol ainsi qu'aux nombreux groupements hydroxyles de la quercétine (voir figure 1.32) [262]. Par ailleurs, le « trolox equivalent antioxidant capacity » (TEAC) est un test largement utilisé afin de déterminer les capacités antioxydantes d'une molécule [261]. Il consiste en l'ajout de la molécule à tester à une solution de radicaux libre ABTS. Après une certaine période de temps, l'absorbance de la solution est lue par spectrophotomètre. Une baisse dans cette absorbance indique une diminution dans la concentration de radicaux libre ABTS, présentant la valeur TEAC de

la molécule comparée à l'antioxydant de référence, le Trolox. La quercétine possède une valeur TEAC de 6,24, indiquant un excellent potentiel antioxydant [261].

De plus, une étude a été réalisée avec des lymphocytes *ex vivo* de femmes volontaires ayant consommé une diète riche en quercétine pendant un mois. Les capacités antioxydantes augmentées de ces femmes protégeaient leurs lymphocytes de dommages oxydants induits chimiquement [264]. La quercétine a aussi protégé de manière significative, et de façon plus efficace que la vitamine C, les neurones PC12 auxquels un traitement oxydant avec du H₂O₂ avait été administré [263].

1.5.5 La quercétine comme anti-inflammatoire

Les capacités anti-inflammatoires ont déjà été prouvées [252]. Un essai clinique à double insu avec placebo a été mené auprès de 30 hommes souffrant de prostatite, une inflammation chronique de la prostate. Selon les résultats obtenus, la quercétine administrée en deux doses de 500 mg améliore de manière significative les symptômes de l'affection [273]. La même dose de quercétine a aussi réduit les symptômes de personnes atteintes de cystite interstitielle, une inflammation chronique des voies urinaires [267].

Par ailleurs, plusieurs études *in vitro* ont démontré que la quercétine inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS par les macrophages [268, 269, 272] et les cellules microgliales [265, 266]. Ce processus semble passer par l'inhibition du facteur de transcription NF- κ B et de la MAPkinase p38, lesquels jouent un rôle essentiel dans la régulation du système immunitaire [266, 269-271]. Ainsi, la quercétine possède bon nombre d'effets anti-inflammatoires pour l'organisme.

1.6 La Sésamine

Le sésame (*Sesamum indicum*) est une plante florale de la famille des Pédaliacées (voir figure 1.34). Il s'agit d'une plante oléagineuse cultivée depuis très longtemps pour

les qualités de son huile. En fait, les caractéristiques bénéfique et nutritive de l'huile de sésame sont recensées depuis plus de 6 000 ans [280]. Par exemple, un ancien livre chinois (300 ans B.C.) a décrit le sésame comme une bonne nourriture avec plusieurs effets physiologiques, spécialement utiles comme apport en énergie et pour prévenir le vieillissement lorsqu'il est consommé sur une longue période de temps [280].



FIGURE 1.34 Plante de sésame



FIGURE 1.35 Graine de sésame

Ainsi, les graines de sésame sont fortement utilisées pour leur haut contenu en huile (50 %), leur grande valeur nutritive (20 % protéine) et leur grande stabilité contre la dégradation oxydative (voir figure 1.35) [280]. Cette dernière caractéristique semble être attribuable à leur contenu en lignans. Plusieurs études ont démontré que les lignans possédaient plusieurs caractéristiques bénéfiques : normalisation de la pression sanguine [281-283], potentiel hypocholestérolémique [284-286], caractère antioxydant [287-291] et diminution de l'inflammation [292-297]. Les graines de sésame et son huile dérivée contiennent une quantité considérable de sésamine, sésamoline et sésaminol [298].

1.6.1. La biodisponibilité de la sésamine

Il a été démontré que la sésamine était le lignan majoritaire dans les graines (concentration d'environ 0,4 % dans l'huile de sésame ; voir figure 1.36) [299]. Son caractère hautement hydrophobie lui permet d'être distribuée dans les tissus de l'organisme, incluant le cerveau. Toutefois, une très faible concentration de sésamine a pu être détectée au niveau du sérum et du foie. Seulement 0,15 % de la sésamine ingérée

était absorbée par la lymphe et conduite au foie, d'où elle est distribuée aux différents tissus [285]. De plus, après 24 heures, il ne reste plus aucune trace de sésamine; celle-ci est entièrement convertie en entérolactone et en entérodiole par la flore intestinale [300, 301].

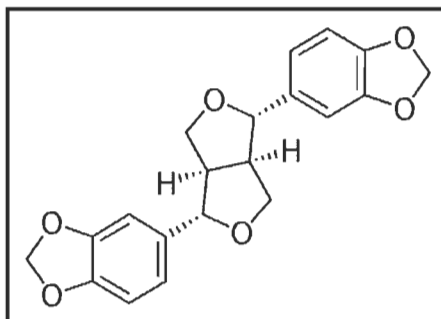


FIGURE 1.36 Structure de la sésamine

1.6.2. La sésamine comme anti-hypertensive

Le sésame présente un potentiel anti-hypertenseur. Il a été constaté que des souris nourries avec un apport quotidien en graine de sésame présentaient moins de risque de développer une pression sanguine élevée, comparativement aux souris témoins [282]. De plus, parmi un échantillon de 396 patients hypertendus d'une étude clinique réalisée en 2004, 356 patients ont consommé quotidiennement de l'huile de sésame. Cette habitude alimentaire a permis de diminuer de façon remarquable la pression sanguine et la dose de médicaments anti-hypertenseurs de ces gens a pu être diminuée [283].

Très récemment, une étude a permis d'identifier la sésamine comme molécule responsable de l'effet anti-hypertenseur. En effet, cette étude clinique sur un groupe de 25 personnes aux prises avec une hypertension modérée a révélé que la prise quotidienne de 10 mg de sésamine provoquait une diminution au niveau de la pression sanguine diastolique et systolique [281]. La sésamine semble ainsi être une excellente molécule naturelle anti-hypertensive.

1.6.3. L'activité hypocholestérolémique de la sésamine

La sésamine présente aussi un effet biologique au niveau du métabolisme des lipides [284-286]. Hirose et son équipe ont observé que des souris nourries avec de la sésamine (0,5 % de leur alimentation quotidienne) pendant quatre semaines présentaient des niveaux de cholestérol significativement plus bas au niveau du foie et du sérum [285]. Il semblerait que cette diminution serait due à la réduction de l'activité de l'enzyme hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase par la sésamine [285]. Cette enzyme est essentielle pour les voies métaboliques qui conduisent à la production du cholestérol.

Par ailleurs, au niveau d'une étude clinique, 12 hommes présentant un niveau de cholestérol élevé ont été évalués suite à leur prise quotidienne de sésamine (32 mg par jour). Chez les 6 hommes traités à la sésamine, le cholestérol total diminuait tout comme le niveau de lipoprotéine de basses densités, comparativement au groupe contrôle composé des 6 hommes restants ayant reçu un placebo [284]. Ces LDL sont responsables du transport du cholestérol vers les cellules. Ainsi, la sésamine possède de bons effets hypocholestérolémiques.

1.6.4. La sésamine comme antioxydante

Il y a longtemps maintenant que le caractère hautement stable contre la dégradation oxydative de l'huile de sésame est reconnu [302]. Ce potentiel antioxydant a maintes fois été démontré par des études *in vivo* impliquant une alimentation enrichie en sésame [288, 290, 303]. Par exemple, il a été démontré que les niveaux d'alpha-tocophérol plasmatique et hépatique augmentaient chez des rats déficients en cette molécule par un supplément en graine de sésame [303]. Le tocophérol ou vitamine E est une vitamine liposoluble reconnue comme un puissant antioxydant. Cette étude a aussi démontré qu'une dose régulière de graines de sésame était plus efficace qu'un supplément en alpha-tocophérol pour assurer une bonne défense antioxydante au niveau de cerveau de rat [303].

Ainsi, il semble que ces effets antioxydants soient en partie dus à la présence de la sésamine [289, 291]. Par exemple, il a été démontré que la sésamine protégeait de l'hypoxie neuronale les cellules PC12 en supprimant la production de ROS et en maintenant l'activité enzymatique de deux enzymes nécessaires à la détoxification cellulaire : la catalase et la superoxyde dismutase [289]. Il a aussi été démontré que la sésamine possédait la capacité de neutraliser les RL grâce à ses nombreux groupements dioxy-méthylène [287]. Bref, la sésamine possède plusieurs propriétés différentes conférant un potentiel antioxydant aux graines de sésame.

1.6.5 La sésamine comme anti-inflammatoire

Le sésame posséderait un potentiel anti-inflammatoire [292, 293, 296]. En effet, il a été démontré que l'huile de sésame, en supplément chez des souris, provoque l'augmentation de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [292].

Encore une fois, le caractère bénéfique semble provenir de la sésamine. Une étude sur des rats révèle qu'une diète enrichie en sésamine diminuait les taux sanguins de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α et de la PGE2, deux grands médiateurs de l'inflammation [297]. Cet effet a été confirmé plusieurs fois avec de nombreux marqueurs inflammatoires [294, 295, 297]. Par exemple, dans un modèle *in vitro* de cellules microgliales BV-2, la sésamine a diminué l'activation microgliale par la suppression de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 via l'inhibition des voies de signalisation cellulaire impliquant les facteurs MAPK p38 et NF- κ B [294]. Ainsi, la sésamine présente un potentiel d'immunorégulation sur plusieurs modèles différents.

1.7 Mes objectifs de recherche

Tel qu'il a été discuté au cours de l'introduction, les causes provoquant la neuropathogenèse de la MP sont encore inconnues. Cependant, il est bien connu aujourd'hui que les processus de neuroinflammation y jouent un rôle certain. Ainsi, afin

d'étudier en profondeur cette neuroinflammation, mon premier objectif de maîtrise était de valider et de comparer l'utilisation de trois toxines, le MPP+, le PQ et le LPS, comme activatrices de la microglie et donc comme modèle de neuroinflammation.

Le second objectif de ma recherche était de vérifier si la quercétine et la sésamine possédaient un potentiel anti-inflammatoire au niveau des cellules microgliales N9 activées avec l'une des trois toxines précédemment mentionnées.

Afin de déterminer le potentiel d'activation microgliale et donc neuroinflammatoire des trois toxines, j'ai vérifié le niveau de transcription de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 ainsi que le niveau d'expression de l'enzyme iNOS chez les cellules microgliales N9 traitées ou non avec les trois toxines. Ensuite, les capacités anti-inflammatoires des deux molécules naturelles ont été étudiées en prétraitement aux toxines selon les mêmes paramètres inflammatoires, soit la transcription d'IL-6 et l'expression d'iNOS. Finalement, afin de valider mes résultats par un modèle plus fidèle à la réalité, j'ai utilisé une coculture microgliale N9 - neuronale PC12. Ainsi, j'ai étudié le potentiel de mes deux molécules naturelles pour réduire la mortalité neuronale par une diminution de la neuroinflammation au niveau des cellules microgliales

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériaux utilisés

Tous les réactifs et matériaux ont été achetés chez Sigma (Ontario, Canada) à moins d'avis contraire.

2.2 Cultures cellulaires

La lignée cellulaire microgliale immortalisée N9 (généreusement fournies par le Dr. L. Vallières, Centre de recherche, CHUL, Québec, QC, Canada; voir figure 2.1) et les cellules neuronales PC12 (ATCC, Rockville, MD; voir figure 2.2) sont maintenues en vie dans un incubateur à 37 °C sous une atmosphère humide à 5 % de CO₂. Les cellules N9 sont cultivées dans du « Dulbecco's modified Eagle's medium-F12 » (DMEM-F12) enrichi de 10 % de sérum de cheval (HS; Invitrogen, Toronto, ON, Canada) et de gentamicine (50 µg/ml). Les cellules PC12 sont cultivées dans du *Roswell Park Memorial Institute medium*-1640 (RPMI-1640) enrichi de 5 % de sérum bovin fœtal (FBS; Invitrogen, Toronto, ON, Canada), de 10 % de HS et de gentamicine (50 µg/ml). La différenciation neuronale DAergique était induite par l'ajout de NGF à une concentration de 50 ng/ml dans du milieu RPMI-1640 supplémenté de 1 % de FBS pour une durée de 3 jours. Tous les sérums utilisés étaient prétraités au charbon pour enlever toute trace de stéroïde. Le milieu de culture était changé tous les 2 jours.

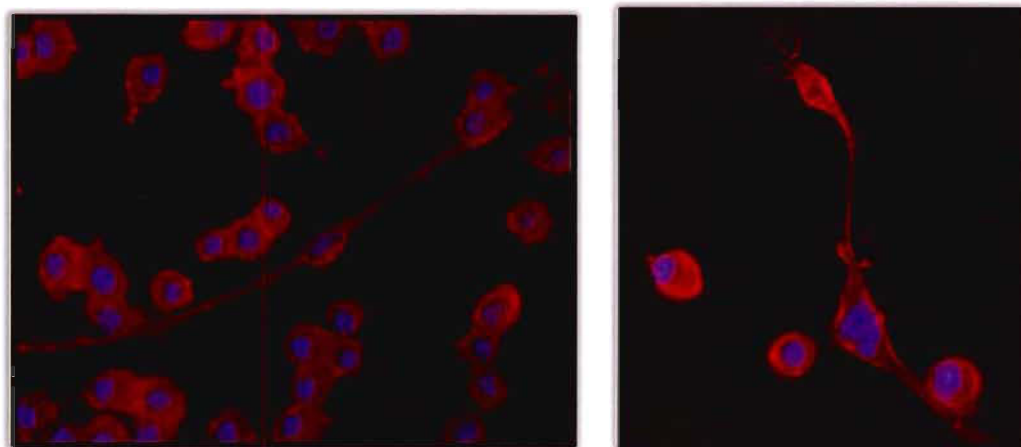


FIGURE 2.1 Les cellules microgliales N9 en immunofluorescence. Rouge = Cy3 pour la β -actine, Bleu = DAPI pour les noyaux

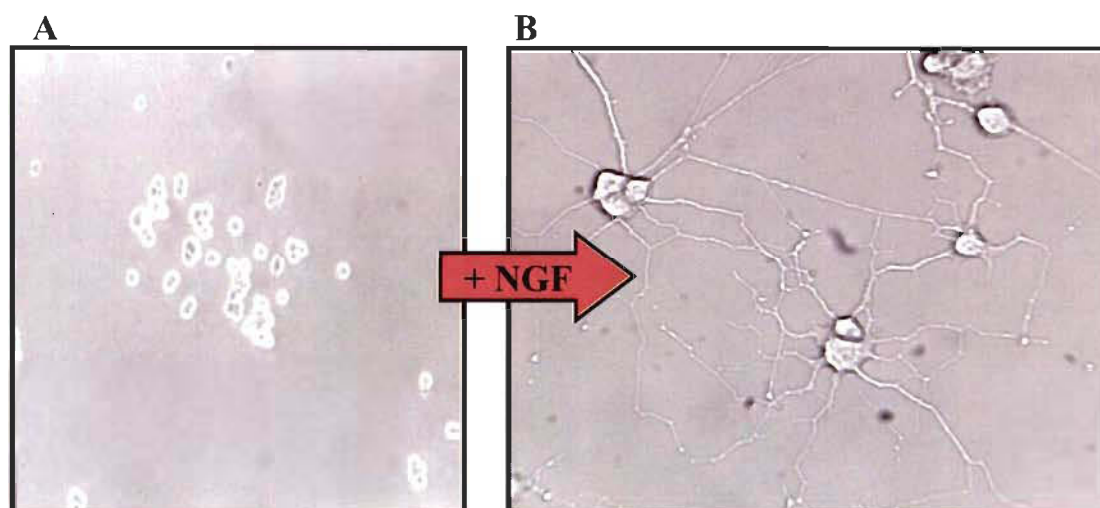


FIGURE 2.2 Cellules neuronales PC12 (A) Natives, non différenciées (B) Différenciées, suite à l'ajout de NGF.

Un système de coculture microgliale N9 – neuronale PC12 a été utilisé afin de déterminer le potentiel anti-inflammatoire de la quercétine et de la sésamine au niveau de la mort neuronale induite par l'induction d'une neuroinflammation. Ainsi, les cellules microgliales N9 furent mises en culture dans des inserts (Falcon, USA; voir figure 2.3). Ces inserts possèdent une membrane de polyéthylène téréphtalate munie de pores de $0,4 \mu\text{m}$ qui permettent l'échange de facteurs tout en empêchant le contact cellulaire. Les cellules PC12 destinées à cette coculture furent cultivées sur des lamelles prétraitées avec du collagène dans des plaques de 24 puits, dans le but de réaliser un test de détection de la fragmentation d'ADN par la technique TUNEL (voir figure 2.4).



FIGURE 2.3 Exemples d'inserts utilisés en coculture

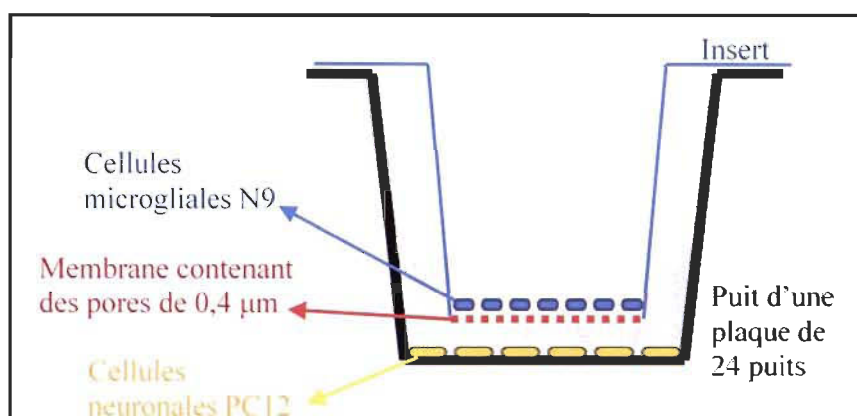


FIGURE 2.4 Schémas démontrant l'organisation de la coculture microgiale N9 – neuronale PC12

2.3 Traitements cellulaires

Afin de valider notre modèle cellulaire pour l'étude du potentiel anti-inflammatoire de la quercétine et de la sésamine, une analyse dose-réponse a été réalisée avec les deux neurotoxines MPP⁺ et PQ. Ainsi, les cellules microgliales N9 ont été mises en culture dans des plaques de 6 puits. Après 24 heures de croissances, ces cellules subissaient un traitement avec du MPP⁺ ou du PQ à des concentrations de 10, 50, 100, 500 ou 1000 μ M, pour une autre période de 24 heures.

Ensuite, afin d'identifier le meilleur temps de traitement pour l'obtention d'une réponse microgiale optimale avec les trois toxines MPP⁺, PQ et LPS, une étude cinétique dans le temps fut réalisée, selon la transcription de la cytokine IL-6 et selon

l'expression de la protéine iNOS. Ainsi, après 24 heures de croissances en plaque de 6 puits, un traitement avec soit 500 μ M de MPP+, 500 μ M de paraquat ou 1 μ g/mL de LPS fut administré aux cellules microgliales pour une période de 6, 9, 12 ou 24 heures. La concentration de LPS administrée provient de l'étude de doses-réponses effectuées précédemment [265].

Puis, dans le but de vérifier le potentiel de la quercétine et de la sésamine à diminuer la transcription de la cytokine IL-6 et l'expression de la protéine iNOS, les cellules microgliales furent mises en culture dans des plaques de 6 puits. Un premier prétraitement avec la quercétine 0,1 μ M ou la sésamine 1 pM fut administré aux cellules microgliales N9. Chacune des doses des molécules naturelles utilisées ici provient de l'étude de doses-réponses réalisées antérieurement [304, 305]. Après 3 heures, chacune des molécules était ajoutée aux puits pour maintenir les concentrations ainsi que la toxine, en l'occurrence le MPP+, le PQ ou le LPS. Le traitement avec les toxines durait 9 heures pour l'expression de la protéine iNOS et 12 heures pour la transcription de la cytokine IL-6. La figure 2.5 présente un schéma des traitements réalisés (voir figure 2.5).

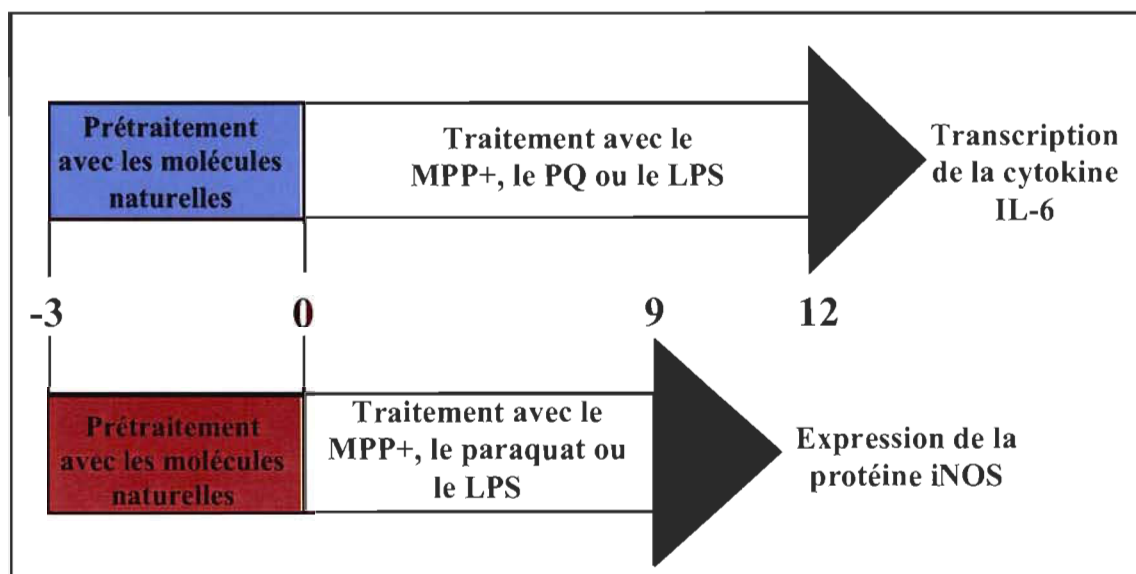


FIGURE 2.5 Prétraitements avec les molécules naturelles et traitement avec les toxines MPP+, paraquat et LPS au niveau des cellules microgliales N9

Finalement, afin de vérifier le potentiel protecteur de la quercétine et de la sésamine sur la mortalité neuronale induite par la neuroinflammation, un modèle de coculture microgliale N9 – neuronale PC12 fut utilisé, comme précédemment décrit à la section 2.2. Ce potentiel a été déterminé en analysant l'expression de la cytokine IL-6, selon la mortalité neuronale induite par les cellules microgliales, ainsi que l'apoptose neuronale induite. Ainsi, les cellules microgliales N9 dans les inserts furent d'abord prétraitées avec la quercétine ou la sésamine, pour une période de 3 heures. Ensuite, les cellules furent activées avec l'une des trois toxines : MPP+, PQ ou LPS. Immédiatement après l'ajout des solutions des toxines, les inserts étaient transférés dans les puits contenant les cellules PC12 différenciées avec le NGF, pour une période supplémentaire de 24 heures. Ainsi, au cours de ce 24 heures, il y avait échange de facteurs inflammatoires de l'environnement des cellules microgliales N9 vers les cellules PC12 et vice-versa. La figure 2.6 schématise les traitements des cellules pour la coculture.

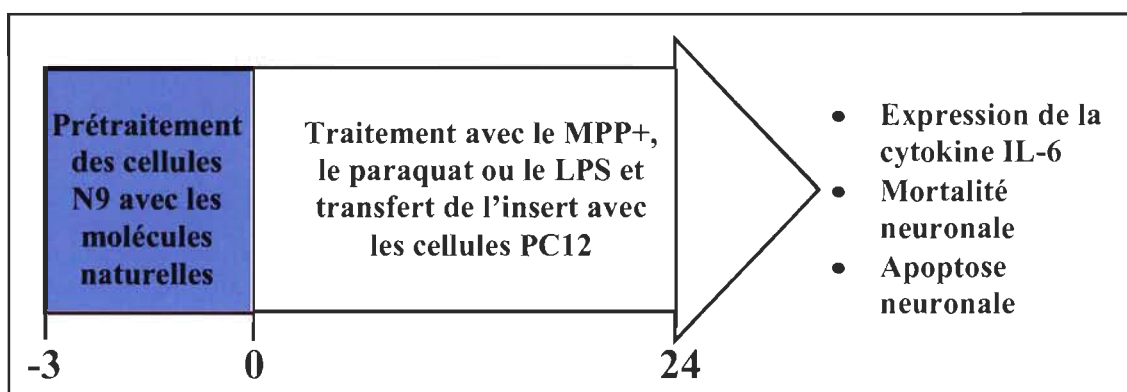


FIGURE 2.6 Traitements pour la coculture microgliale N9 – neuronale PC12

2.4 Mesure de la mortalité cellulaire

La mortalité cellulaire a été évaluée dans le but de réaliser une analyse dose-réponse de la mortalité cellulaire en fonction de la concentration du MPP+ et du PQ ainsi qu'afin de vérifier la mortalité neuronale induite par la neuroinflammation microgliale. La mortalité cellulaire a été analysée grâce à un test colorimétrique basé sur le dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH). En effet, lors du processus de mort cellulaire, la LDH, qui est présente dans toutes les cellules, est relâchée dans

l'environnement. De plus, il a été démontré que l'activité enzymatique retrouvée dans le surnageant était proportionnelle à la quantité de cellules lysées [306, 307].

Brièvement, 50 μ l de surnageant dépourvu de cellule était prélevé après chaque traitement. À ce surnageant était ajoutée une solution contenant du p-iodonitrotétrazolium violet, du NAD^+ et de l'acide lactique dans un tampon Tris à pH 8,2. Ainsi, la LDH du surnageant convertit le lactate en pyruvate de façon proportionnelle à sa concentration, avec l'aide du NAD^+ (voir figure 2.7). Le NADH obtenu pourra fournir un proton au sel de tétrazolium qui sera réduit en sel de formazan de couleur rouge et dont l'absorbance pourra être dosée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Thermolab System, Franklin, MA). La figure 2.7 représente la réaction exploitée pour le dosage de l'activité de la LDH.

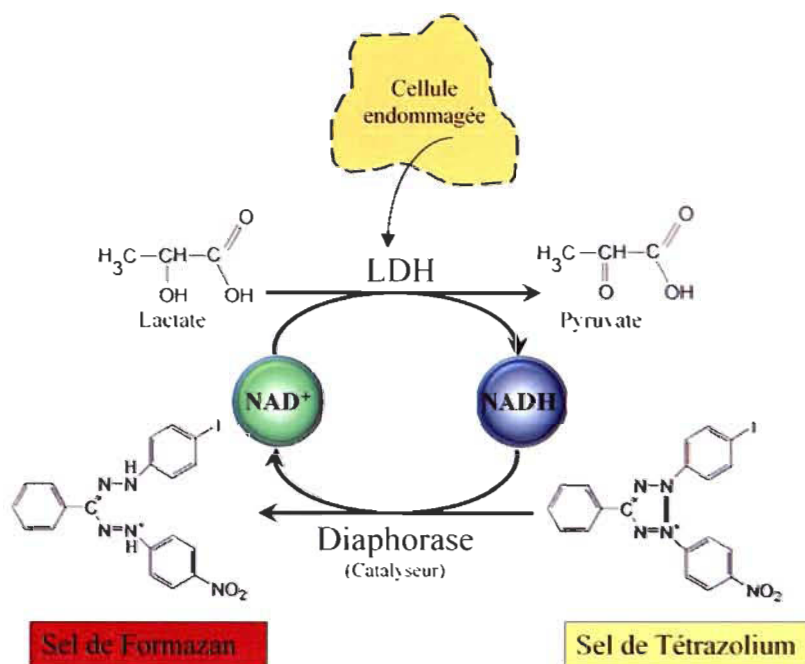


FIGURE 2.7 Réaction colorimétrique du dosage de l'activité de la LDH

Le pourcentage de mortalité cellulaire attribuable aux agents neurotoxiques fut calculé selon la mortalité de base et la mortalité maximale. La mortalité de base correspond à la mortalité des cellules n'ayant pas été soumises aux neuroprotecteurs ni aux toxines, conférant ainsi la mortalité basale. La mortalité maximale correspond à la

mortalité des cellules traitées avec une solution de 1 % de Triton X-100, de manière à lyser la totalité des cellules. L'équation 2.1 fut utilisée :

$$\text{Mortalité cellulaire (\%)} = \frac{(\text{Valeur expérimentale} - \text{Mortalité de base})}{(\text{Mortalité maximale} - \text{Mortalité de base})} \times 100 \%$$

ÉQUATION 2.1 Formule pour évaluer le pourcentage de mort cellulaire

2.5 RétroTranscription - Réaction en chaine par polymérase quantitative (RT-qPCR)

L'ARN total des cellules microgliales N9 traitées a été extrait grâce au kit d'extraction « GenElute Mammalian Total RNA », puis dosé grâce à un spectrophotomètre. Un µg de cet ARN total était ensuite soumis à une phase de rétro-transcription (RT) pour obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc), avec 25 U de l'enzyme reverse transcriptase M-MULV, 1,5 µM de désoxy nucléotide triphosphate et 10 µM d'amorces aléatoires (Invitrogen, Ontario, Canada). Une amplification PCR était ensuite appliquée sur cet ADNc avec l'instrument MiniOpticon Real-time PCR system (BioRad, Hercules, USA). La réaction était effectuée en solution de 20 µL contenant 4 µL de l'ADNc, 0,3 µM de chacune des amorces sens et anti-sens ainsi que 10 µL d'iQ SYBR green Supermix (BioRad, Hercules, USA). Chaque solution était incubée à une température de 95 °C pendant 3 min, suivie de 40 cycles qui comprennent 15 sec à 95 °C puis 30 sec à 61 °C. Les amorces spécifiques pour la cytokine IL-6 (5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT-3' et 5'-ATTTCCACGATTGCCAGAG-3'), l'ubiquitine C (5'-AGCCCAGTGTTACCACCAAG-3' et 5'-TCACACCCAAGAACAAGCAC-3') et la β-microglobuline (5'-ATGGGAAGCCGAACATACTG-3' et 5'-CAGTCTCAGTGGGGGTGAAT-3') ont été synthétisées chez Sigma Genosys (Oakville, ONT). Chaque réaction était réalisée en duplicatas et trois préparations indépendantes d'ADNc furent utilisées pour les compilations et statistiques. Pour chaque amorce, une courbe standard fut réalisée par la réaction de sept dilutions en série de 1:10 d'une solution d'ADNc de concentration inconnue. La moyenne des valeurs correspondant au « cycle threshold » (Ct) ainsi obtenu pour chaque dilution fut portée sur un graphique en fonction du log de la quantité

d'ADNc. L'efficacité de la réaction et donc de l'amorce était calculée selon l'équation de la droite obtenue par ce graphique (voir équation 2.2).

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{pente}}\right)}$$

ÉQUATION 2.2 Équation pour calculer l'efficacité d'une réaction, où E correspond à l'efficacité et la « pente » correspond à la pente de la droite générée par le graphique préalablement réalisé

Toutes les efficacités des gènes étaient supérieures à 90 %. Pour chaque expérience, une analyse post-PCR avec une courbe de fusion fut réalisée afin d'attester la spécificité du produit obtenu. Ainsi, pour chaque courbe de fusion, la température était augmentée de 1 °C chaque seconde et chaque fois, la fluorescence était lue. La transcription comparative de chaque gène fut calculée selon la méthode delta Ct utilisant l'efficacité réelle de chaque amorce calculée selon la courbe standard décrite plus haut [308, 309]. La quantité d'ADNc parmi les échantillons était normalisée selon l'expression de deux gènes de références : l'ubiquitine C et la β -2-microglobuline. Ces gènes de références furent choisis selon le programme GeNORM algorithm [309]. Ce programme calcule un facteur de normalisation à l'aide de la moyenne géométrique des deux gènes de références. Ainsi, le calcul de la transcription relative divisé par le facteur de normalisation approprié permet de déterminer l'expression normalisée de l'ARN de chaque gène d'intérêt [309].

2.6 Immunobuvardage de type « Western »

Les protéines totales ont été extraites avec le « Nuclear Extraction Kit » (Active Motif, Carlsbad, CA), et diluées dans 50 μ L de solution de lyse. Leur concentration a été déterminée grâce au « BCA Protein Assay Kit » (Pierce, Rockford, IL). Une quantité équivalente de protéine a été chargée sur un gel 12 % de polyacrylamide sodium dodecyl sulfate. Après une séparation électrophorétique (120 volts, 1 h 30), les gels de polyacrylamide ont été transférés sur des membranes de nylon PVDF (pores de 0,22 μ m, BioRad, Hercules, CA) à 60 volts pour 2 h. Les membranes ainsi obtenues ont été incubées dans une solution de blocage constituée de 5 % de lait en poudre écrémé pour

toute une nuit à une température de 4 °C, dans le but de supprimer les liaisons non spécifiques d'anticorps. Par la suite, l'immunobuvardage a été réalisé toute la nuit à 4 °C avec un anticorps polyclonal fait chez le lapin, pour la protéine iNOS (1 : 50; StressGene, Biotech, Ann Arbor, MI), dilué dans du « phosphate buffered saline » (PBS). Le jour suivant, les membranes étaient lavées au PBS et un anticorps secondaire anti-lapin conjugué avec une peroxydase diluée 1 : 10 000 était ajouté aux membranes pour 1 h à température de la pièce (TP). Un signal immunopositif était visualisé par chimiluminescence avec le programme AlphaEase FC imaging system (Alpha Innotech, San Leandro, CA) et analysé avec le programme AlphaEase FC software (Alpha Innotech).

2.7 « Enzyme Linked ImmunobSorbent Assay » (ELISA)

Un test ELISA de type sandwich (Biolegend, San Diego, É.-U.) a été réalisé afin de doser l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 au niveau de la coculture microgliale N9 – neuronale PC12. Brièvement, le milieu dans lequel les cellules microgliales N9 baignaient au niveau des inserts était récupéré après le traitement. Chaque échantillon était placé dans une plaque de 96 puits prétraités avec un anticorps de capture, spécifique pour la cytokine IL-6 murine, fourni dans le kit. Une incubation de 2 h à TP permettait ainsi à la cytokine du milieu de se lier aux anticorps de capture. Ensuite, une solution contenant un anticorps de détection conjugué à la biotine, spécifique pour la cytokine était ajoutée, suivi d'une solution de conjugué avidine-peroxydase de raifort. Celle-ci se lie avec une haute affinité à la biotine, présente sur les anticorps de détection. Une solution de tétraméthylbenzidine est ajoutée et produit une couleur bleue qui est proportionnelle à la quantité d'IL-6. Finalement, une solution d'arrêt (H₂SO₄, 1 M) est ajoutée pour transformer la couleur bleue en jaune, laquelle peut être lue à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Thermolab System, Franklin, MA). Quatre lavages avec du tampon de lavage (PBS + 0,05 % Tween-20, pH=7,2) étaient appliqués entre chaque étape.

2.8 Détection de la fragmentation d'ADN par la technique TUNEL

Le marquage de la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL a été utilisé pour analyser l'apoptose [310]. Les noyaux en processus de fragmentation ont été marqués par la technique TUNEL, grâce au kit « In Situ Cell Death Detection » (Roche Diagnostics, Québec, Canada). En effet, ces processus de fragmentation de l'ADN nucléaire sont reconnus pour survenir lors de la mort cellulaire apoptotique. Brièvement, les cellules neuronales PC12 ont été mises en culture dans des plaques de 24 puits (BD Falcon) dans lesquelles des lamelles de vitres prétraitées avec du collagène ont été placées. Une différenciation était alors initiée pour une période de 3 jours avec du NGF, tel que décrit précédemment dans la section 2.2. Après chaque traitement, les cellules étaient lavées à deux reprises avec du PBS et fixées avec du paraformaldéhyde 4 % pour 1 h à 4 °C. Les cellules fixées étaient ensuite perméabilisées avec une solution tampon de gélatine de peau de poisson et de Triton (TBS, 1 % BSA, 0,18 % gélatine de peau de poisson, 0,1 % Triton-X, 0,02 % azoture de sodium) pour 1 heure à TP. Les cellules furent ensuite incubées avec les dUTP conjugués à la fluorescéine, dans une solution de TdT fournie avec le kit pour 1 h 30 à 37 °C dans un environnement humide. La quantité totale des noyaux a été révélée grâce au marquage sans restriction de l'ADN par une solution de 5 µg/mL de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) pour 15 min à 37 °C. Les lamelles de verre ont été montées sur des lames avec le kit « Molecular Probes ProLong Antifade » (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Les images ont été prises avec un microscope à fluorescence Leitz Orthoplan (Leica, Wetzlar, Germany) et les filtres nécessaires. Ces images furent prises et analysées grâce à la caméra Q imaging (Nikon, Ontario, Canada) et au programme NIS-Element 2.2 software (Nikon, Ontario, Canada).

2.9 Analyse statistique

Les différences significatives entre les différentes conditions ont été déterminées par le test statistique One-way ANOVA avec un post-test Bonferroni avec le programme GraphPad InStat, version 3.06, for Windows© (San Diego, CA, www.graphpad.com). Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. de 3 expériences indépendantes, à moins d'avis contraire.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Dose-réponse du MPP⁺ pour l'induction d'une activation microgliale

L'établissement d'une dose-réponse du MPP⁺ fut nécessaire afin de déterminer la quantité optimale de toxine à utiliser pour induire une activation microgliale. En effet, le présent ouvrage est l'un des premiers à utiliser le MPP⁺ directement sur les cultures de cellules microgliales N9. Dans cette optique, j'ai effectué une analyse dose-réponse avec la mortalité cellulaire par LDH et une dose-réponse avec la transcription du facteur inflammatoire qu'est la cytokine IL-6, par RT-qPCR.

3.1.1 La mortalité microgliale en fonction de la concentration de MPP⁺

D'abord, la figure 3.1 montre la mortalité microgliale selon une dose-réponse du MPP⁺ par test LDH. Il est important que la mortalité ne soit pas telle qu'aucune cellule ne puisse survivre. On peut donc constater à la figure 3.1 que l'effet optimal est retrouvé en utilisant une concentration de 500 μ M de MPP⁺.

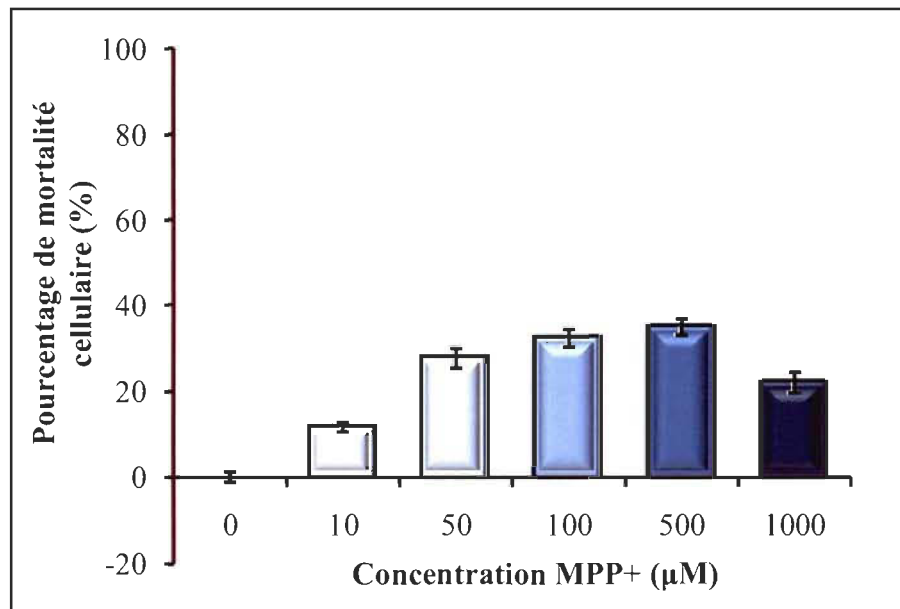


FIGURE 3.1 La mortalité microgliale N9 selon une dose-réponse du MPP⁺, N=1

3.1.2 La transcription de la cytokine IL-6 en fonction de la concentration de MPP+

La réalisation d'une dose-réponse de facteurs inflammatoires en fonction de la toxine MPP⁺ est essentielle afin de déterminer le réel potentiel de la toxine à induire l'activation de la cellule microgliale. Ainsi, la figure 3.2 illustre la dose-réponse du niveau de transcription de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 selon la concentration de MPP⁺, par RT-qPCR. Le MPP⁺, à une concentration de 500 μ M, démontre un bon potentiel d'activation microgliale avec une augmentation dans la transcription de 14 811 % comparé au contrôle. Cette augmentation illustre une activation microgliale qui est amplement suffisante pour nous permettre nos expérimentations.

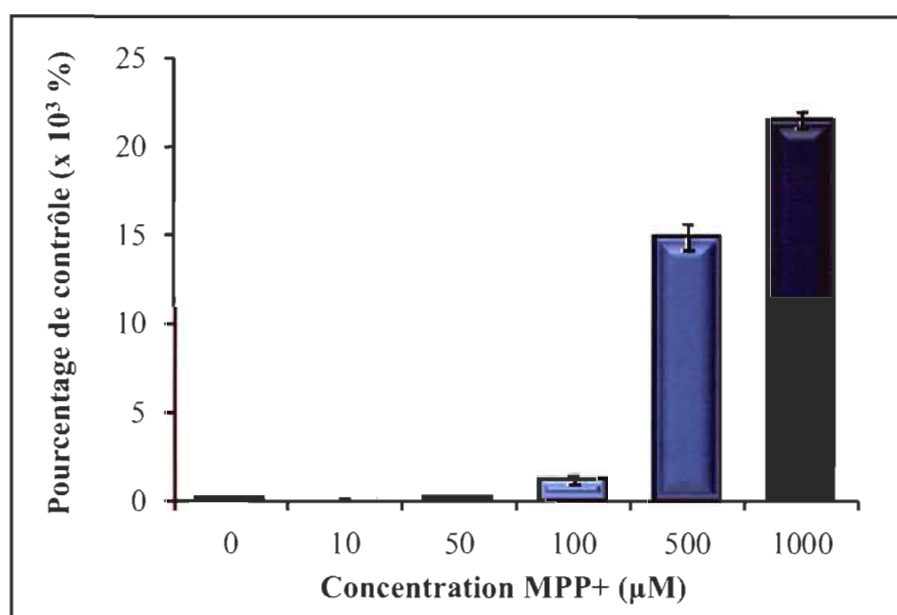


FIGURE 3.2 Niveau de transcription de la cytokine IL-6 chez les cellules microgliales N9 selon une dose-réponse du MPP⁺, N=1

3.2 Dose-réponse du PQ pour l'induction d'une activation microgliale

La réalisation d'une dose-réponse avec le PQ fut nécessaire pour déterminer la concentration de toxine à utiliser afin d'activer la cellule microgliale. Au même niveau que le MPP⁺, j'ai effectué une dose-réponse du PQ avec la mortalité cellulaire par LDH et une dose-réponse avec l'induction de facteurs inflammatoires, et donc avec la transcription de la cytokine IL-6, par RT-qPCR.

3.2.1 La mortalité microgliale N9 en fonction de la concentration de PQ

La figure 3.3 expose la mortalité microgliale en fonction de la concentration de PQ, réalisé avec un test LDH. On peut constater qu'une activation microgliale optimale avec une subséquente production de facteurs inflammatoires et cytotoxiques est retrouvée en utilisant une concentration de 500 μM de PQ.

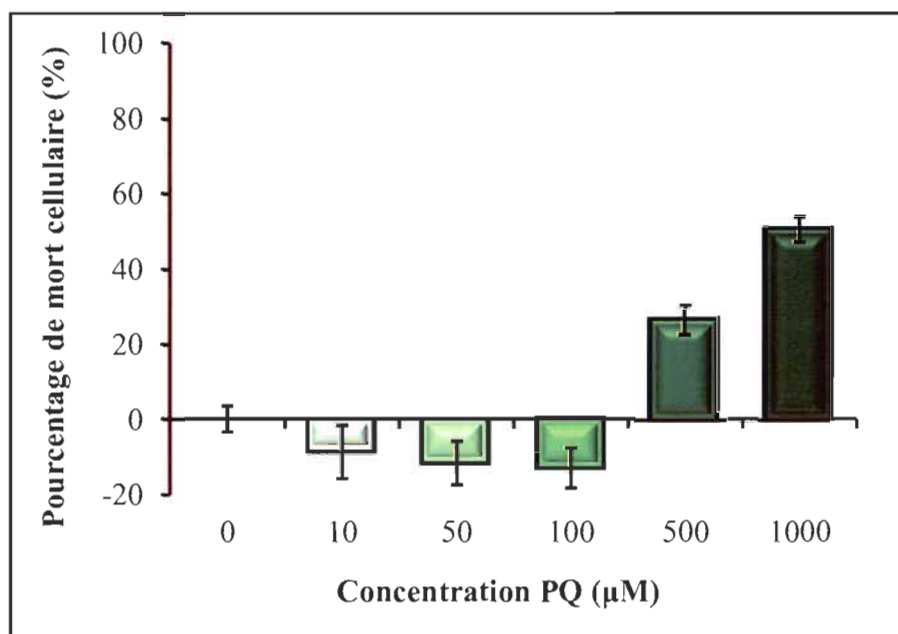


FIGURE 3.3 Mortalité chez les cellules microgliales N9 selon une dose-réponse du PQ, N=1

3.2.2 La transcription de la cytokine IL-6 en fonction de la concentration de PQ

La production de facteurs inflammatoires chez la cellule microgliale représente la preuve de son activation. Ainsi, j'ai réalisé une dose-réponse du PQ avec la transcription de la cytokine IL-6, par RT-qPCR. La figure 3.4 confirme l'utilisation de la concentration de 500 μM pour cette toxine. En effet, une augmentation de 405 % de la transcription de la cytokine comparée au contrôle représente une activation suffisante de la cellule microgliale pour nous permettre nos expérimentations.

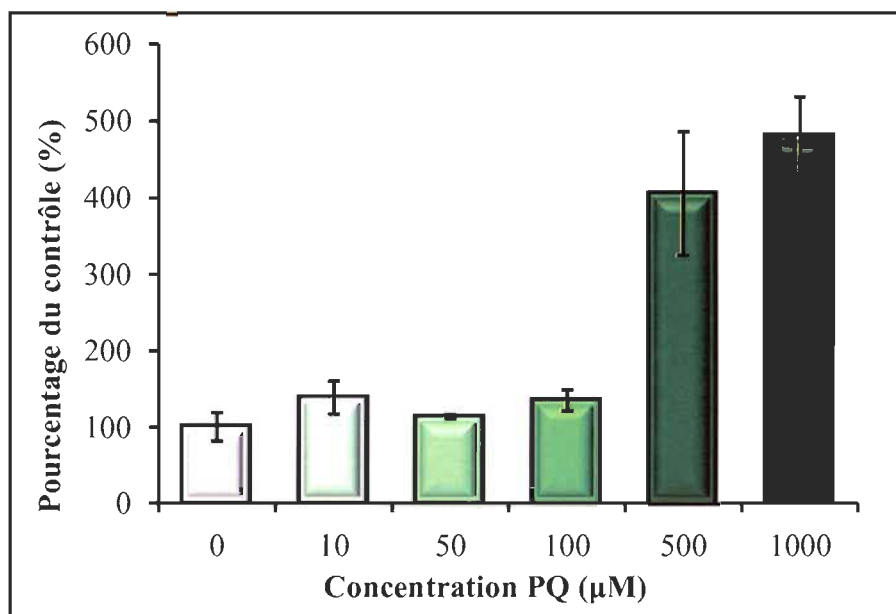


FIGURE 3.4 La transcription de la cytokine IL-6 chez les cellules microgliales N9 selon la dose-réponse du PQ, N=1

3.3 Cinétique dans le temps : Transcription de la cytokine IL-6 dans le temps selon la toxine

Une cinétique dans le temps de la transcription de la cytokine IL-6 en fonction de la toxine a été réalisée afin de comparer le potentiel neuroinflammatoire des trois toxines MPP+, PQ et LPS. La transcription de ce premier paramètre neuroinflammatoire testé en cinétique a été évaluée par la technique RT-qPCR. Comme décrite précédemment dans la section 1.1.4.1, la cytokine IL-6 est un marqueur inflammatoire important exprimé par la cellule microgliale activée.

La figure 3.5 A illustre les résultats de la cinétique de la transcription de la cytokine IL-6 dans le temps, réalisée pour comparer et valider le modèle neuroinflammatoire avec les trois toxines. D'abord, le MPP+ (Bleu) augmente de manière très significative la transcription d'IL-6 comparée au contrôle, et ce, à toutes les heures testées. Toutefois, c'est la condition 12 h qui démontre la meilleure hausse : 3 677 % comparée au contrôle. La figure 3.5 B démontre un agrandissement de la condition 12 h, révélant que cette condition présente aussi une bonne augmentation significative avec les deux autres toxines : 271 % pour le PQ (Vert) et 217 % pour le

LPS (Rouge). Ainsi, le temps 12 h fut adopté pour la transcription de la cytokine dans les expériences suivantes.

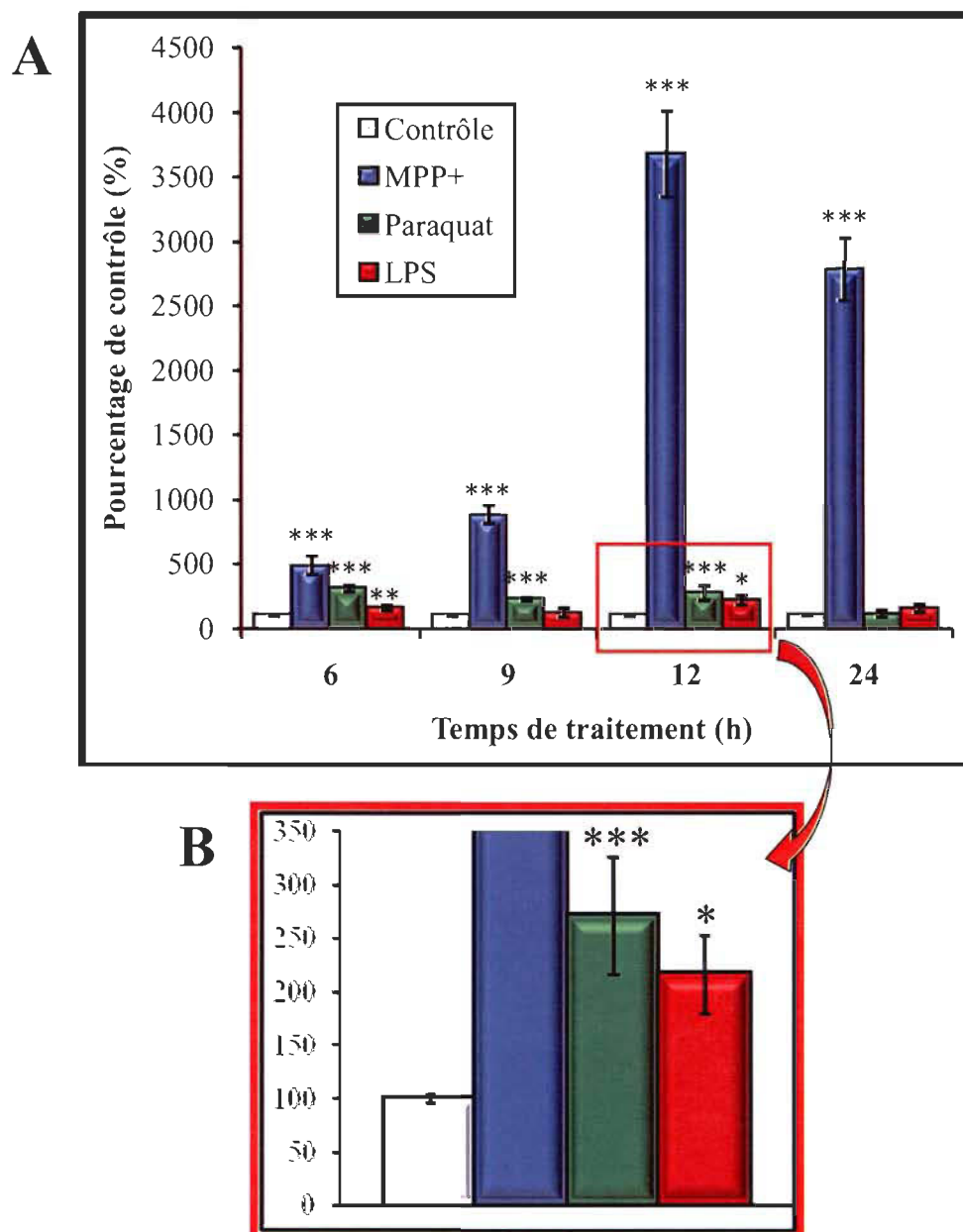


FIGURE 3.5 (A) Cinétique dans le temps de l'effet du MPP+, du PQ et du LPS sur le niveau de transcription de la cytokine IL-6 chez les cellules microgliales N9, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et * $p < 0,05$ vs Contrôle, N=3 **(B)** Agrandissement du temps 12 h

3.4 Cinétique dans le temps : Expression de la protéine iNOS dans le temps selon la toxine

Le potentiel neuroinflammatoire des trois toxines MPP⁺, PQ et LPS a été évalué selon un premier paramètre inflammatoire chez la cellule microgliale : la cytokine pro-inflammatoire IL-6 (voir section 3.3). L'expression de l'enzyme iNOS fut ensuite vérifiée afin de valider et de confirmer le potentiel d'activation microgliale de nos trois toxines. Ce deuxième paramètre inflammatoire fut évalué par immunobuvardage de type « Western ». Comme mentionné dans la section 1.1.4.2, une fois induite chez la cellule microgliale activée, l'enzyme iNOS est responsable de la production du NO.

La figure 3.6 révèle les résultats de la cinétique dans le temps selon l'expression d'iNOS réalisée pour comparer et valider le modèle neuroinflammatoire avec les trois toxines. D'une part, le MPP⁺ (Bleu) semble diminuer l'expression d'iNOS, et ce, de manière constante parmi les conditions testées (environ 50 % du contrôle). Pour ce qui est du PQ (Vert), seul le traitement au temps 9 h a démontré une augmentation significative de 209 % comparée au contrôle. Finalement, le LPS (Rouge) a présenté une bonne induction de l'expression de l'enzyme iNOS au niveau de toutes les conditions, mais le temps 9 h a encore démontré la meilleure hausse avec 252 % du contrôle. Ainsi, le temps 9 h a été utilisé pour les expériences subséquentes.

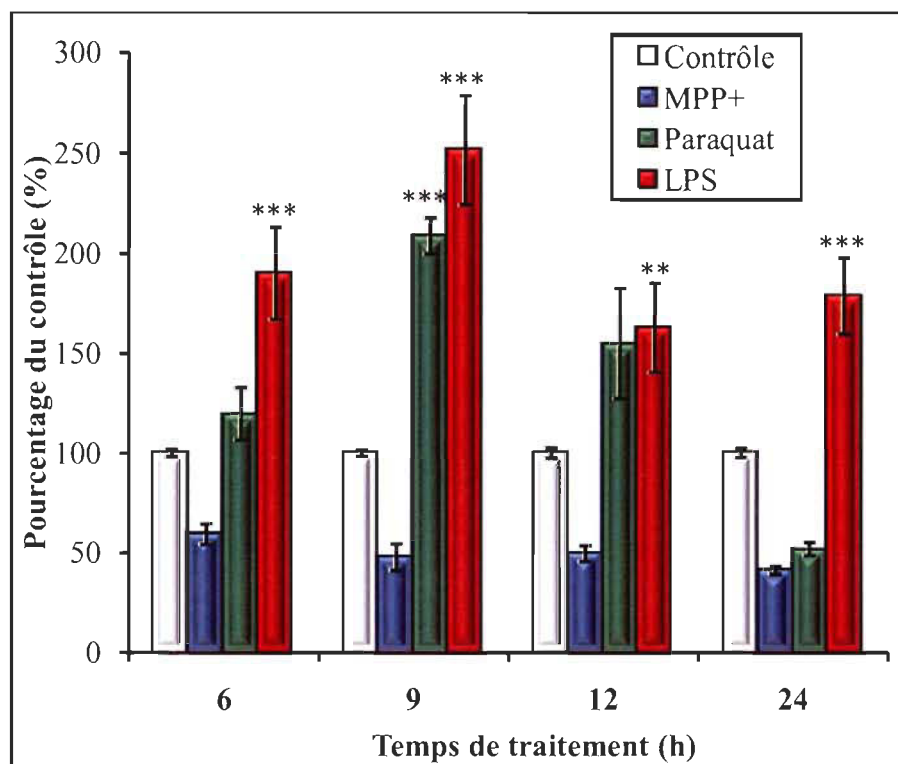


FIGURE 3.6 Cinétique dans le temps de l'effet du MPP+, du PQ et du LPS sur le niveau d'expression de l'enzyme iNOS chez les cellules microgliales N9, *** $p < 0,001$ et ** $p < 0,01$ vs Contrôle, N=3

3.5 Transcription de la cytokine IL-6 en fonction du traitement avec la quercétine et la sésamine

Dans le but de déterminer le potentiel anti-inflammatoire des deux molécules naturelles, la quercétine et la sésamine, le niveau de transcription de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 a été évalué. Ainsi, un prétraitement avec les molécules naturelles était administré aux cellules microgliales. Ensuite, celles-ci étaient activées par l'une des trois toxines, soit le MPP+, le PQ ou le LPS.

Ainsi, la figure 3.7 démontre les résultats obtenus par RT-qPCR illustrant les effets de la quercétine et de la sésamine sur le niveau de transcription de la cytokine IL-6 chez les cellules microgliales N9 activées par le MPP+, le PQ et le LPS. D'abord, les conditions représentant un prétraitement avec uniquement la quercétine ou la sésamine révèlent qu'aucune des deux molécules naturelles n'induit la transcription de la cytokine IL-6. Ensuite, le MPP+ (Bleu) induit une augmentation de 1 456 % du niveau de transcription de la cytokine, en accord avec les résultats précédents. Cette augmentation

est diminuée à 790 % grâce à un prétraitement avec la quercétine et à 887 % avec la sésamine, toujours comparée à la condition contrôle. Par ailleurs, concernant les résultats réalisés avec le PQ (Vert), celui-ci induit une augmentation très significative de 449 % dans la transcription de la cytokine IL-6. Toutefois, le prétraitement avec la quercétine et la sésamine ne permet pas de diminuer cette augmentation (respectivement, 470 % et 438 % comparés au contrôle). Finalement, les traitements avec le LPS (Rouge) au niveau des cellules microgliales N9 augmentent le niveau d'expression de l'ARN de la cytokine IL-6 à 141 %, comme démontré dans la figure 3.7. De plus, cette hausse est diminuée grâce à un prétraitement avec les deux molécules naturelles : 84 % pour la quercétine et 79 % pour la sésamine.

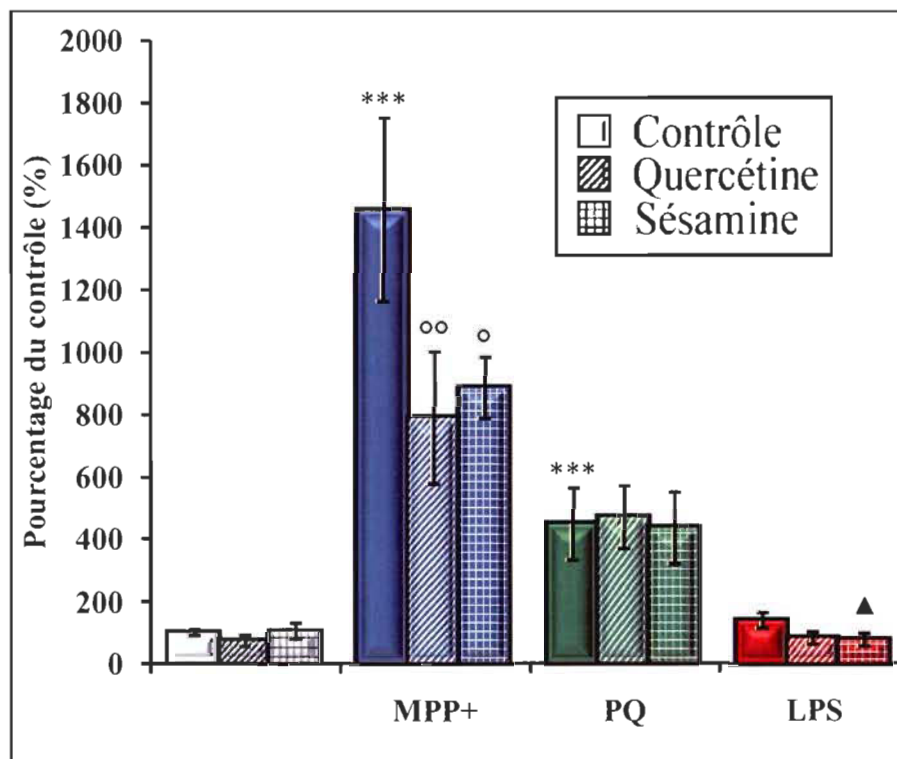


FIGURE 3.7 Effet de la quercétine et de la sésamine sur le niveau de transcription de la cytokine IL-6 chez les cellules microgliales N9 activées par le MPP+, le PQ et le LPS, *** $p < 0,001$ vs Contrôle, °° $p < 0,01$ et ° $p < 0,05$ vs MPP+, ▲ $p < 0,05$ vs LPS, N=3

3.6 Expression de la protéine iNOS en fonction du traitement avec la quercétine et la sésamine

Toujours dans le but de déterminer le potentiel anti-inflammatoire de la quercétine et la sésamine, le niveau d'expression de l'enzyme iNOS a été déterminé suite au

prétraitement avec les molécules naturelles et à l'activation des cellules microgliales N9 avec le PQ et le LPS. Ainsi, le MPP+ n'ayant pas augmenté l'expression d'iNOS, il fut impossible de le considérer dans la présente expérimentation. Ce deuxième paramètre neuroinflammatoire a été évalué par immunobuvardage de type « Western ».

La figure 3.8 présente l'effet de la quercétine et de la sésamine sur l'expression d'iNOS par les cellules microgliales N9 activées par le PQ et le LPS. D'abord, le traitement des cellules microgliales N9 avec uniquement l'une ou l'autre des deux molécules naturelles ne présente pas de hausse dans l'expression d'iNOS, comparativement à la condition contrôle (123 % pour la quercétine et 117 % pour la sésamine). Ensuite, le LPS et le PQ administrés aux cellules microgliales induit une hausse très significative dans l'expression d'iNOS. En effet, un traitement au LPS (Rouge) provoque une hausse de 360 % tandis que l'augmentation est de 198 % pour le PQ (Vert), toujours comparée au contrôle. Par ailleurs, les cellules ayant subi un prétraitement avec les molécules naturelles avant l'administration du LPS ont démontré une réduction de l'expression d'iNOS égale à 238 % pour la quercétine et à 240 % pour la sésamine. Toutefois, les molécules naturelles n'ont pas diminué la hausse provoquée par le PQ : 218 % avec la quercétine et 244 % pour la sésamine.

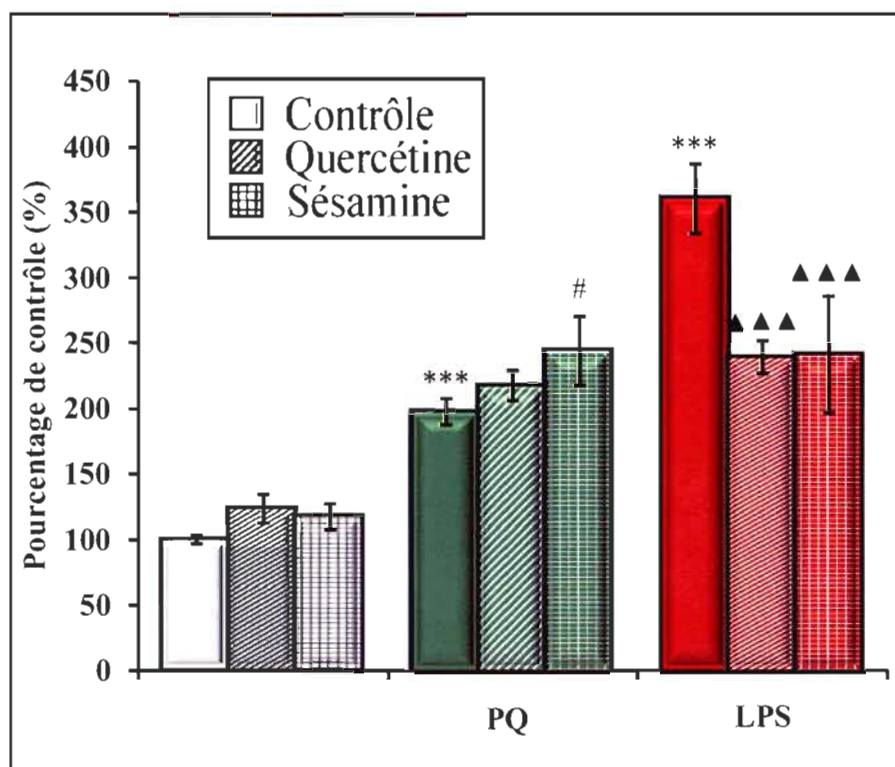


FIGURE 3.8 Effet de la quercétine et de la sésamine sur l'expression d'iNOS par les cellules microgliales N9 activées par le PQ et le LPS, *** $p < 0,001$ vs Contrôle, # $p < 0,05$ vs PQ, ▲▲▲ $p < 0,001$ vs LPS, N=3

3.7 Détermination de la mortalité neuronale induite par les cellules microgliales en fonction du traitement dans un modèle de coculture microgliale N9 - neuronale PC12

Afin de reproduire de manière plus fidèle les processus neuroinflammatoires impliqués dans la MP, un système de coculture microgliale N9 – neuronale PC12 a été mis au point. Afin de s'assurer que l'effet des toxines est imputable à l'induction d'une activation microgliale, il fut nécessaire de vérifier l'effet du MPP+, du PQ et du LPS dans un système ne contenant aucune microglie. Pour ce faire, la mortalité neuronale a été évaluée par un dosage de la LDH neuronale libérée.

Ainsi, la figure 3.9 présente l'effet des trois toxines selon la mortalité neuronale induite, en présence ou non de cellules microgliales. D'abord, aucune des conditions sans N9 ne présente de mortalité neuronale. En effet, le résultat est de – 16,25 % pour le MPP+ (Bleu), de – 24,94 % pour le PQ (Vert) et de – 15,87 % pour la coculture traitée au LPS (Rouge), toujours comparé au contrôle. Par contre, en présence de cellules

microgliales N9, des traitements avec le MPP+, le PQ et le LPS induisent une mortalité neuronale comparée au contrôle (respectivement, 12,35 %, 24,24 % et 6,44 %).

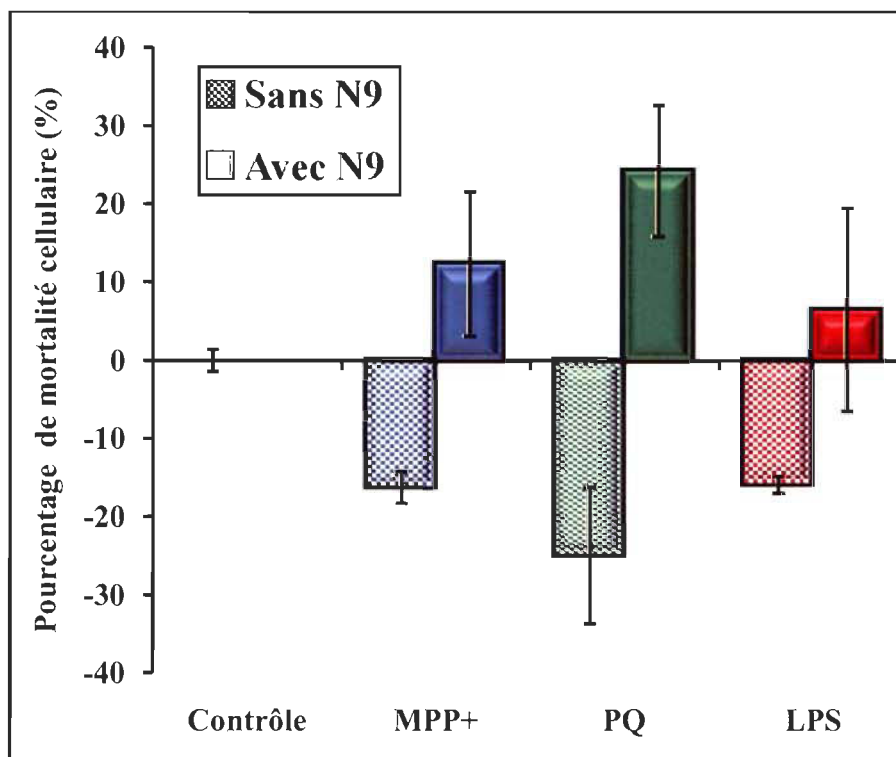


FIGURE 3.9 Effet du MPP+, du PQ et du LPS sur la mort neuronale dans un modèle de coculture microgliale N9 - neuronale PC12, en présence ou non des cellules microgliales, N=1

3.8 Expression de la cytokine IL-6 en fonction du traitement avec la quercétine et la sésamine dans un modèle de coculture microgliale N9 – neuronale PC12

Dans le but de déterminer le potentiel anti-inflammatoire des deux molécules naturelles au sein du système de coculture microgliale N9 – neuronale PC12, il était nécessaire d'abord de déterminer le niveau d'activation microgliale. Pour ce faire, un dosage de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 a été réalisé par technique ELISA.

La figure 3.10 présente l'effet de la quercétine et de la sésamine sur l'expression d'IL-6 dans le modèle de coculture N9-PC12. Encore une fois, les deux molécules naturelles administrées seules n'induisent pas d'augmentation dans l'expression de la cytokine IL-6 (58 % pour la quercétine et 77 % pour la sésamine). Ensuite, les trois

toxines présentent une bonne augmentation dans l'expression de la cytokine : 344 % pour le MPP+ (Bleu), 184 % pour le PQ (Vert) et 230 % après un traitement au LPS (Rouge). Finalement, au niveau des trois toxines, un prétraitement avec la quercétine ou la sésamine a permis de diminuer cette augmentation au niveau de la cytokine pro-inflammatoire. En effet, la quercétine a diminué à 250 % la hausse provoquée par le MPP+, à 120 % celle attribuée au PQ et finalement à 154 % l'augmentation due au traitement avec le LPS. Pour ce qui est de la sésamine, celle-ci est responsable de la baisse de l'expression de la cytokine IL-6 induite par le MPP+ à 212 %, à 110 % pour celle induite par le PQ et à 162 % pour la hausse démontrée avec le LPS.

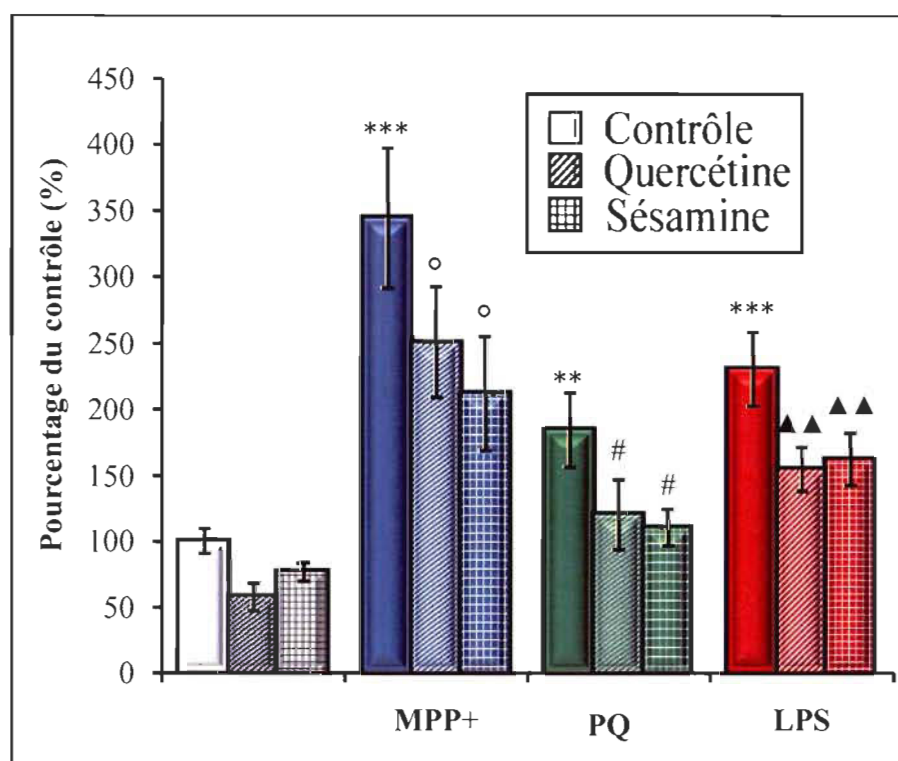


FIGURE 3.10 Effet de la quercétine et de la sésamine sur l'expression d'IL-6 dans un modèle de coculture microgliale N9 - neuronale PC12, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs Contrôle, ° $p < 0,05$ vs MPP+, # $p < 0,05$ vs PQ, ▲▲ $p < 0,01$ vs LPS, N=4

3.9 Mortalité neuronale induite par les microglies en fonction du traitement avec la quercétine et la sésamine dans un modèle de coculture microgliale N9 – neuronale PC12

Toujours dans le but d'utiliser un modèle neuroinflammatoire le plus fidèle possible à l'expérimentation *in vivo*, la mortalité neuronale induite par une activation

microgliale a été évaluée dans le système de coculture microgliale N9 – neuronale PC12. Ainsi, afin de doser les effets néfastes de la neuroinflammation sur les cellules neuronales PC12, la quantité de LDH libérée dans le milieu a été dosée.

La figure 3.11 illustre l'effet de la quercétine et de la sésamine sur la mort neuronale dans le modèle de coculture. Premièrement, ici encore, la quercétine et la sésamine n'induisent pas de mortalité neuronale. Ensuite, les trois toxines administrées aux cellules microgliales ont entraîné une mortalité neuronale : 19 % pour la condition MPP+, 17 % pour le PQ et finalement 27 % pour la coculture traitée au LPS. Un prétraitement avec la quercétine et la sésamine a permis de réduire cette mortalité de manière très significative pour les trois toxines.

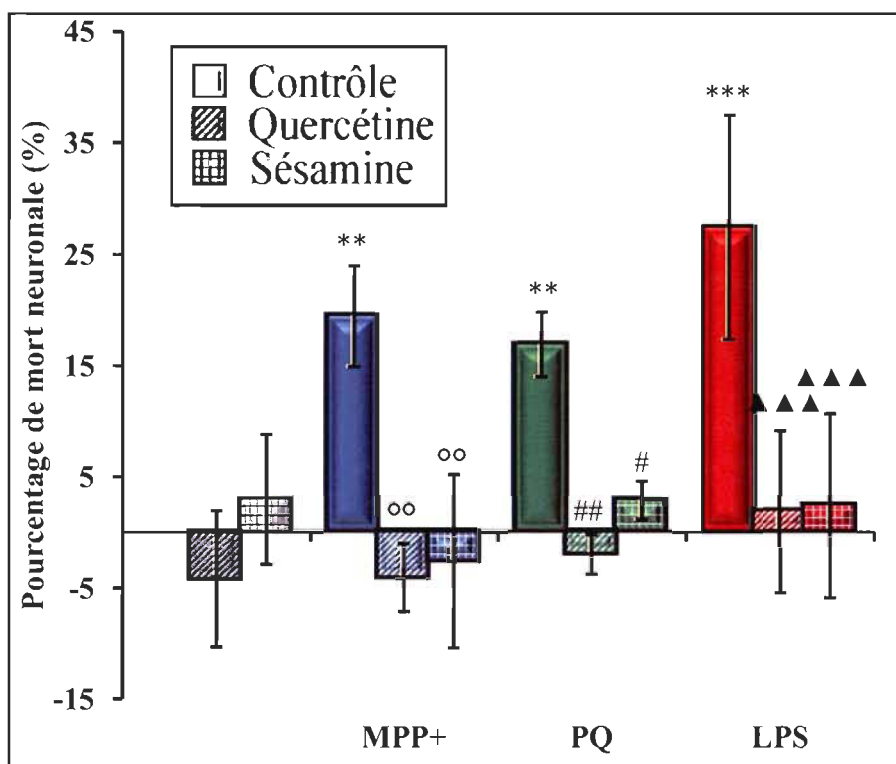


FIGURE 3.11 Effet de la quercétine et de la sésamine sur la mort neuronale dans un modèle de coculture microgliale N9 - neuronale PC12, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et Contrôle, °° $p < 0,01$ vs MPP+, ## $p < 0,01$ et # $p < 0,05$ vs PQ, ▲▲▲ $p < 0,001$ vs LPS, N=3

3.10 Mortalité apoptotique neuronale induite par les microglies en fonction du traitement avec la quercétine et la sésamine dans un modèle de coculture microgiale N9 – neuronale PC12

Le système de coculture a aussi été utilisé dans le but de déterminer la nature de la mortalité neuronale par un marquage en immunofluorescence au TUNEL. Comme décrit à la section 2.8, le TUNEL marque spécifiquement les noyaux en processus de fragmentation d'ADN, une caractéristique retrouvée dans la mort par apoptose.

La quantification des cellules positives au TUNEL a été réalisée à partir de plusieurs champs de vision sur plusieurs lamelles pour un décompte cellulaire jusqu'à 100. La figure 3.13 montre la compilation des décomptes cellulaires de chaque photo. Ainsi, ces photos ne sont pas représentatives du décompte final. Afin de permettre une meilleure compréhension et d'alléger ce mémoire, les photos présentant les conditions utilisant chacune des toxines ont été présentées (voir figure 3.12).

La figure 3.13 illustre les résultats de l'effet de la quercétine et de la sésamine sur le marquage au TUNEL dans le modèle de coculture. La quercétine et la sésamine à elles seule n'induisent pas d'augmentation dans le marquage au TUNEL des noyaux (respectivement, 6,8 % et 7,3 %). Par ailleurs, le MPP+ (Bleu) et le PQ (Vert) provoquent une hausse dans ce marquage. En effet, le MPP+ augmente à 33,6 % et le PQ à 32,3 %, les processus de fragmentation d'ADN. De plus, la quercétine diminue ces processus à 19,4 % en traitement avec le MPP+ et à 6,2 % avec le PQ. Pour ce qui est de la sésamine, c'est jusqu'à 13 % qu'elle réduit la hausse provoquée par le MPP+. Les nombreux processus de fragmentation retrouvés suite au traitement du PQ chez les cellules microgliales sont diminués à 10,6 % grâce à la sésamine. Finalement, le LPS (Rouge) n'a pas réussi à provoquer une hausse dans le marquage des noyaux au TUNEL (5,5 %), malgré la mortalité neuronale démontrée dans les résultats précédents.

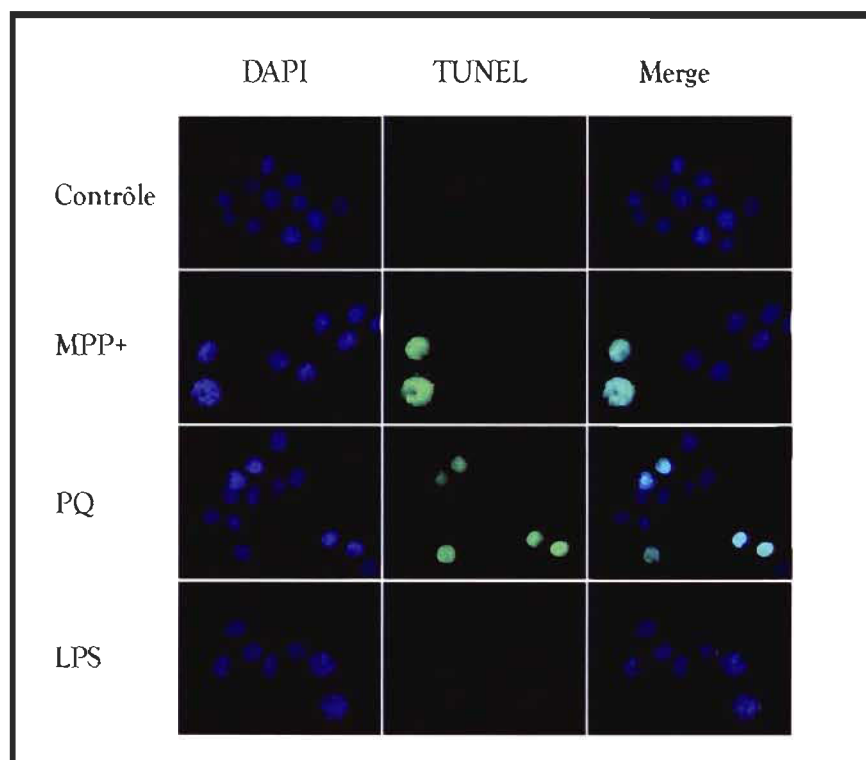


FIGURE 3.12 Marquage au DAPI (noyaux totaux = bleu) et au TUNEL (noyaux en fragmentation = vert) des cellules PC12.

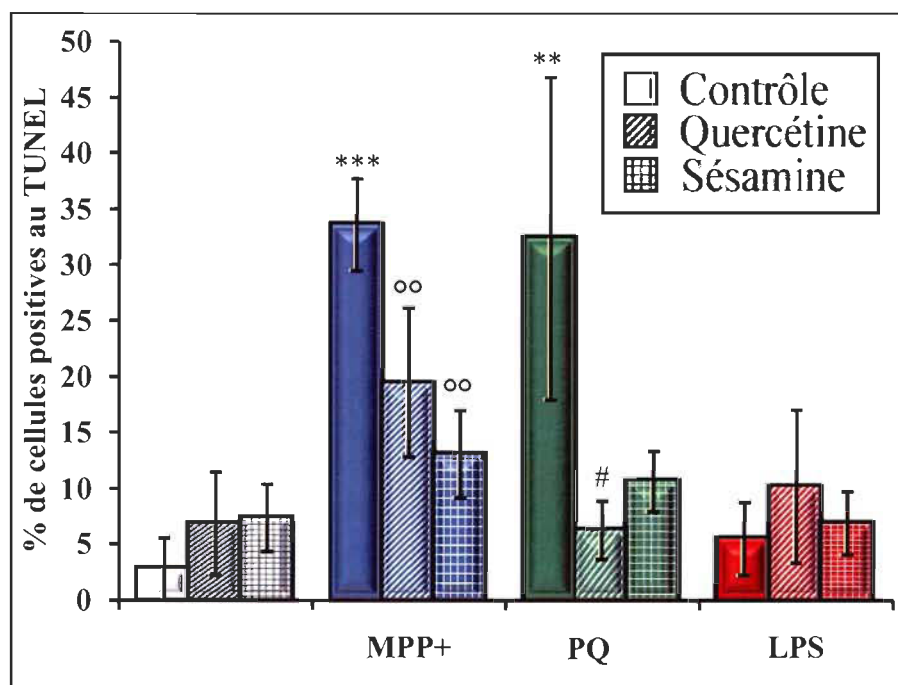


FIGURE 3.13 Effet de la quercétine et de la sésamine sur le marquage au TUNEL dans un modèle de coculture microgliale N9 - neuronale PC12, *** $p < 0,001$ et ** $p < 0,01$ vs Contrôle, °° $p < 0,01$ vs MPP+, # $p < 0,05$ vs PQ, N=3

CHAPITRE 4

DISCUSSION

La MP est la deuxième maladie neurodégénérative la plus commune après la MA [156]. Son étiologie demeure inconnue. Cependant, de nombreuses études ont démontré l'implication de la neuroinflammation dans la pathogenèse et dans la progression de la MP [311]. De plus, il a été prouvé que les AINS étaient particulièrement bénéfiques au niveau de la progression de plusieurs maladies neurodégénératives [220-222, 312].

La cellule microgliale est responsable de la neuroinflammation par sa capacité d'activation et son immunocompétence. Une fois activée, elle produit plusieurs facteurs inflammatoires tels que les cytokines et le NO [84, 313]. Plusieurs études présentent l'effet neuroprotecteur apporté par une inhibition de l'activation microgliale [314, 315]. Il a été aussi démontré que les cytokines pro-inflammatoires exprimées par la microglie activée entraînent l'apoptose neuronale et précèdent la neurodégénérescence DAergique dans des modèles murins de la MP [141].

Les caractéristiques des neurones DAergiques les rendent très sensibles à l'inflammation : une haute concentration en fer et en lipides, un mécanisme d'oxydation de la DA ainsi qu'une faible capacité antioxydante [316-318]. Ainsi, la progression de la MP a été associée à plusieurs paramètres inflammatoires tels qu'une augmentation du niveau de cytokines pro-inflammatoires [319] ainsi qu'à une hausse au niveau du NO [320].

Au niveau clinique, les traitements proposés aux patients parkinsoniens demeurent exclusivement symptomatiques, vu le mystère persistant entourant l'étiologie de la maladie. Ainsi, dans de tels cas, il devient important et pertinent d'explorer les possibilités thérapeutiques préventives. À ce titre, la quercétine et la sésamine sont deux molécules naturelles retrouvées dans plusieurs aliments consommés quotidiennement. Elles ont d'ailleurs déjà démontré leurs effets biologiques bénéfiques sur une panoplie

de modèle : un potentiel anti-cancer, des capacités antioxydantes ainsi que plusieurs effets anti-inflammatoires (voir section 1.5 et 1.6)

Le but de cette étude était donc d'abord de valider un modèle d'étude *in vitro* d'inflammation. À cette fin, j'ai déterminé et comparé le potentiel neuroinflammatoire de trois toxines, le MPP+, le PQ et le LPS. Le second objectif de mes expérimentations était d'évaluer l'effet de la quercétine et de la sésamine sur l'inflammation induite par ces trois toxines.

Ainsi, je devais d'abord déterminer et comparer le potentiel neuroinflammatoire du MPP+, du PQ et du LPS (voir section 3.1 à 3.4).

D'abord, le MPTP et son métabolite actif, le MPP+, sont des toxines largement utilisées dans les modèles *in vivo* et *in vitro* pour l'étude de la MP. Le MPTP provoque une neuroinflammation chez les humains et les singes par l'action délétère du MPP+ qui agit de manière sélective au niveau DAergique. Cette inflammation est soutenue, même plusieurs années après l'administration de MPTP [62, 321]. Le PQ, un herbicide puissant, provoque lui aussi une neurotoxicité sélective à la SNpc. D'ailleurs, cette toxicité a été associée à une implication obligatoire des cellules microgliales [240]. La troisième toxine, le LPS, est une composante de la membrane des bactéries Gram négative. Cette endotoxine est l'une des plus puissantes activatrices reconnues de la cellule microgliale et par conséquent, une grande inductrice de neuroinflammation [241].

Mes résultats de recherche ont ainsi mis en évidence le potentiel neuroinflammatoire des trois toxines, d'abord par une augmentation dans la transcription de la cytokine pro-inflammatoire IL-6, une cytokine largement impliquée dans la neuroinflammation retrouvée dans la MP [91, 92, 111, 115]. Le deuxième paramètre inflammatoire étudié était l'expression de l'enzyme iNOS, celle-ci responsable de la production de NO par la cellule microgliale. Le niveau protéique de cet enzyme était augmenté par un traitement des cellules microgliales avec le PQ et le LPS. Par contre, le

MPP⁺ a plutôt diminué l'expression de ce facteur microglial inflammatoire important. Au niveau de la littérature, notre laboratoire est le premier à avoir utilisé le MPP⁺ directement sur des cellules microgliales en culture. Les références sont donc restreintes. D'une part, Du et son équipe ont démontré que la minocycline protégeait les neurones DAergiques contre l'administration de MPTP dans un modèle murin de la MP [322]. Ils ont établi que cette protection passait via l'inhibition de la formation de NO par les cellules gliales [322]. D'autre part, Wu et son équipe ont prouvé que les cultures primaires pures de microglie ne présentaient pas d'activation à l'ajout de MPP⁺, contrairement aux cultures mixtes neuronales microgliales [231]. La cellule microgliale nécessite-t-elle une mort neuronale pour se mettre à produire du NO? Les expérimentations de ce mémoire n'ont analysé que la protéine iNOS. En est-il autrement au niveau moléculaire? Ces questions demeurent toujours un mystère.

Malgré tout, les trois toxines présentent un potentiel neuroinflammatoire par l'augmentation d'au moins un marqueur inflammatoire. Ce mémoire est donc l'un des premiers ouvrages à soutenir le potentiel de la toxine MPP⁺ comme inducteur d'inflammation par l'activation microgliale.

En second lieu, j'avais comme objectif d'évaluer les capacités anti-inflammatoires de deux molécules naturelles, la quercétine et la sésamine (voir section 3.5 et 3.6).

D'abord, la quercétine est un polyphénol ayant déjà démontré plusieurs excellents effets bénéfiques dans plusieurs systèmes du corps humain (voir section 1.5). De plus, plusieurs études ont démontré son potentiel anti-inflammatoire [265, 268-270]. Une étude a prouvé qu'elle inhibait la production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS au niveau des macrophages et des cellules microgliales activées [268, 272]. Par ailleurs, ma deuxième molécule d'intérêt, la sésamine, est un lignan présent chez les plantes. À son tour, la sésamine a démontré posséder un bon potentiel anti-inflammatoire, par la diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Mes résultats ont ainsi confirmé le potentiel anti-inflammatoire de mes deux molécules naturelles. En effet, la quercétine et la sésamine administrées en prétraitement ont induit une diminution

significative de la transcription de la cytokine IL-6 provoquée par le MPP+ et le LPS. Cependant, l'augmentation de la transcription de la cytokine IL-6 suite à l'ajout de LPS est beaucoup moins marquée que celle retrouvée suite à l'ajout de MPP+. La littérature nous décrit pourtant le LPS comme une puissante activatrice de la microglie. Il est toutefois important de se rappeler que l'étude de la neuroinflammation est un domaine fort nouveau, et que le rôle précis de chacune des cytokines n'est pas encore bien compris. L'analyse de paramètres inflammatoires supplémentaires dans ce modèle pourrait répondre à cette interrogation. Malgré le manque de différence statistique, le résultat à propos du LPS à la figure 3.7 démontre tout de même une tendance à la hausse et celle-ci est légèrement diminuée par un prétraitement avec la quercétine ou la sésamine.

La quercétine et la sésamine administrées en prétraitement ont aussi induit une diminution du deuxième facteur inflammatoire testé, soit l'expression de l'enzyme iNOS. Par contre, le PQ a bien réussi à induire une activation microgliale, mais intéressement, ni la quercétine, ni la sésamine ne sont arrivées à réduire la hausse des deux paramètres inflammatoires. Ces résultats semblent démontrer que le PQ possède un mécanisme d'activation microgliale différent de celui du LPS ou du MPP+. D'ailleurs, plusieurs études tendent à soutenir cette hypothèse. En effet, l'implication du facteur nucléaire κ B et de la voie des MAPK p38 a été démontrée dans l'activation microgliale induite par le MPP+ et le LPS, contrairement au PQ qui implique plutôt la voie des kinases ERK 1/2 [61, 323, 324]. De plus, la sésamine et la quercétine semblent inhiber les voies de facteur nucléaire κ B et de MAPK p38, pouvant expliquer pourquoi les deux molécules naturelles n'ont pas protégé contre le PQ [269, 294]. Évidemment, il est tout à fait prématuré de spéculer davantage sur ces résultats, sans d'abord explorer les voies de signalisation intracellulaire.

Afin de valider mes résultats obtenus avec la quercétine et la sésamine, j'ai évalué le potentiel de ces deux molécules naturelles à diminuer la mortalité neuronale induite par une neuroinflammation et donc par une activation microgliale. D'abord, l'augmentation de l'expression de la cytokine IL-6 confirme bien la réelle activation

microgliale au sein de mon modèle de coculture (voir section 3.8). Ici les pourcentages d'expression de la cytokine IL-6 en fonction du contrôle sont beaucoup plus faibles que ceux observés en culture simple. Trois hypothèses peuvent expliquer cette différence. D'abord, la surface retrouvée dans les inserts (en coculture) est beaucoup plus petite que celle retrouvée dans les plaques de six puits utilisées en culture simple. Cette caractéristique amène une différence dans la densité cellulaire. Ensuite, il s'agit ici d'un dosage protéique et non du niveau de transcription de l'ARN. Finalement, les conditions de coculture et la mort basale des cellules provoquent un état d'activation microgliale basale qui pourrait expliquer le plus faible écart entre la condition contrôle et les conditions correspondant à l'une des trois toxines.

Par ailleurs, mes résultats démontrent clairement que lorsque des neurones PC12 sont mis en coculture avec des cellules microgliales N9 traitées avec les trois toxines, le niveau de mort neuronale est augmenté de manière significative par rapport au contrôle (voir section 3.9). D'ailleurs, cette mort est nettement imputable à l'activation microgliale subséquente aux traitements avec les trois toxines, comme que démontré dans la section 3.7. Par contre, il n'est pas possible de distinguer la LDH en provenance des neurones PC12 de celle en provenance des cellules microgliales. Toutefois, la quantité de cellules microgliales présentes dans les inserts de la coculture est nettement moindre que celles présentes dans les plaques de six puits pour l'analyse dose-réponse de la mortalité cellulaire en fonction de la concentration de MPP⁺ et de PQ.

Ainsi, la quercétine et la sésamine administrées en prétraitement réduisent clairement le niveau de mortalité neuronale en coculture. Finalement, le marquage augmenté au TUNEL suggère que la mortalité neuronale engendrée par l'activation microgliale serait de nature apoptotique (voir section 3.10). Ainsi, par mes résultats, je propose que la quercétine et la sésamine réduisent la mortalité neuronale apoptotique DAergique induite par l'activation microgliale et sa subséquente production de facteurs inflammatoires tels que le NO via la protéine iNOS et la cytokine IL-6.

CHAPITRE 5

CONCLUSIONS

Par cette étude, j'ai démontré que les trois toxines MPP⁺, PQ et LPS induisent la production de facteurs inflammatoires par la cellule microgliale. De plus, mes résultats proposent la quercétine et la sésamine comme molécules naturelles capables de réduire l'expression de ces facteurs. Finalement, par la diminution de cette neuroinflammation, la sésamine et la quercétine ont démontré diminuée la mortalité neuronale liée à l'activation microgliale.

Mes résultats me permettent donc de conclure que le MPP⁺, le PQ et le LPS possèdent un potentiel neuroinflammatoire. De plus, les expérimentations simultanées de chacune des toxines ont révélé que les trois molécules toxiques possèdent un mécanisme d'activation microgliale différent, comme discuté dans le chapitre précédent. Ensuite, la présente étude me permet d'affirmer que la quercétine et la sésamine présentent un potentiel anti-inflammatoire et que celui-ci est protecteur contre la mortalité neuronale.

Comme perspective de recherche, il serait intéressant d'aller vérifier d'autres marqueurs neuroinflammatoires au niveau de la cellule microgliale suite aux traitements avec le MPP⁺, le PQ et le LPS. Comme démontré à la section 1.1.4, il existe une multitude de facteurs sécrétés par la microglie dans le but d'implanter une neuroinflammation, telle que le TNF- α , les IL anti-inflammatoires, l'O₂[•] et l'OH[•]. Ainsi, la quercétine et la sésamine pourront être évaluées face à leur effet sur ces nouveaux marqueurs inflammatoires, ce qui pourrait valider et renforcer ma conclusion relative au pouvoir anti-inflammatoire des deux molécules naturelles. D'autre part, il serait avantageux d'aller explorer les différentes voies de signalisation intracellulaire impliquées suite à l'ajout des toxines ou des neuroprotecteurs. Comme mentionnée dans la discussion, cette hypothèse pourrait expliquer les distinctions entre les activations microgliales et ainsi éclaircir l'absence de protection contre le PQ.

Par ailleurs, mes résultats ont suggéré la nature apoptotique de la mortalité neuronale engendrée par la neuroinflammation. Toutefois, cette hypothèse n'est basée que sur un marquage TUNEL. Il serait donc important de confirmer ces résultats avec d'autres marqueurs apoptotiques pour pouvoir ainsi affirmer que la neuroinflammation provoque la mort apoptotique des neurones dans notre modèle. Parmi les marqueurs apoptotiques, la voie des caspases, le dosage de la relâche du cytochrome C par la mitochondrie ainsi que l'expression du facteur inducteur d'apoptose sont tous des candidats intéressants. Finalement, il serait aussi intéressant de vérifier l'effet d'un autre type glial, les astrocytes, sur les modèles neuroinflammatoires présentés dans ce mémoire. En effet, les astrocytes semblent posséder un potentiel d'inhibition de l'activation microgliale et pourraient s'avérer très bénéfiques dans la problématique présente.

Ce mémoire présente donc des résultats particulièrement intéressants puisqu'ils supportent le rôle important de ces molécules naturelles en tant que thérapie préventive ou complémentaire pour les maladies impliquant une neuroinflammation menant à la neurodégénération telle que la MP. Avec une population de plus en plus vieillissante, il devient très important de trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Ainsi, une diète riche en quercétine et en sésamine pourrait devenir une approche innovatrice pour maintenir une bonne qualité de vie chez les patients atteints de la MP.

RÉFÉRENCES

1. Finlay, B.B. and R.E. Hancock, *Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections?* Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(6): p. 497-504.
2. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
3. Matusevicius, D., et al., *Multiple sclerosis: the proinflammatory cytokines lymphotoxin-alpha and tumour necrosis factor-alpha are upregulated in cerebrospinal fluid mononuclear cells.* J Neuroimmunol, 1996. **66**(1-2): p. 115-23.
4. McGeer, P.L., et al., *Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains.* Neurology, 1988. **38**(8): p. 1285-91.
5. Bagetta, G., M.T. Corasaniti, and S.A. Lipton, *Neuroinflammation in neuronal death and repair.* International review of neurobiology ; v. 82. 2007, Amsterdam ; London: Elsevier Academic Press. xxiv, 474 , [26] of plates.
6. O'Callaghan, J.P., K. Sriram, and D.B. Miller, *Defining "neuroinflammation".* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1139**: p. 318-30.
7. Shirai, Y., *On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals.* Jap Med World, 1921. **1**: p. 14-15.
8. Medawar, P.B., *Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye.* Br J Exp Pathol, 1948. **29**(1): p. 58-69.

9. Matyszak, M.K. and V.H. Perry, *Demyelination in the central nervous system following a delayed-type hypersensitivity response to bacillus Calmette-Guerin*. Neuroscience, 1995. **64**(4): p. 967-77.
10. Stevenson, P.G., et al., *The immunogenicity of intracerebral virus infection depends on anatomical site*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 145-51.
11. Galea, I., I. Bechmann, and V.H. Perry, *What is immune privilege (not)?* Trends Immunol, 2007. **28**(1): p. 12-8.
12. Wekerle, H., *[The enigma of arrival: [corrected] the entrance of auto-immune T lymphocytes in central nervous tissues and of their attack against the myelin structures]*. C R Biol, 2007. **330**(1): p. 1-12.
13. Weiss, N., et al., *The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(4): p. 842-57.
14. Martini, F., E.F. Bartholomew, and W.C. Ober, *Essentials of anatomy & physiology*. 4th ed. 2007, San Francisco, CA; London: Pearson/Benjamin Cummings.
15. Petty, M.A. and E.H. Lo, *Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation*. Prog Neurobiol, 2002. **68**(5): p. 311-23.
16. Bush, T.G., et al., *Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice*. Neuron, 1999. **23**(2): p. 297-308.

17. Stangel, M., *Neuroprotection and neuroregeneration in multiple sclerosis*. J Neurol, 2008. **255 Suppl 6**: p. 77-81.
18. Desai, B.S., et al., *Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy*. Cell Transplant, 2007. **16**(3): p. 285-99.
19. Barres, B.A., *The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease*. Neuron, 2008. **60**(3): p. 430-40.
20. Engelhardt, B., *Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier*. J Neural Transm, 2006. **113**(4): p. 477-85.
21. Degos, V., et al., *[Inflammation and acute brain injuries in intensive care]*. Ann Fr Anesth Reanim, 2008. **27**(12): p. 1008-15.
22. Hirsch, E.C. and S. Hunot, *Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?* Lancet Neurol, 2009. **8**(4): p. 382-97.
23. Huang, X., et al., *CD 4+ T cells in the pathobiology of neurodegenerative disorders*. J Neuroimmunol, 2009. **211**(1-2): p. 3-15.
24. Popovich, P.G. and E.E. Longbrake, *Can the immune system be harnessed to repair the CNS?* Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(6): p. 481-93.
25. Pender, M.P. and M.J. Rist, *Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia*. Glia, 2001. **36**(2): p. 137-44.
26. Frigerio, S., et al., *Modulation of fas-ligand (Fas-L) on human microglial cells: an in vitro study*. J Neuroimmunol, 2000. **105**(2): p. 109-14.

27. Bachmann, R., et al., *Impairment of TNF-receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice.* Am J Pathol, 1999. **154**(5): p. 1417-22.
28. Zettl, U.K., et al., *Apoptosis of myelin-reactive T cells induced by reactive oxygen and nitrogen intermediates in vitro.* Cell Immunol, 1997. **178**(1): p. 1-8.
29. Farina, C., F. Aloisi, and E. Meinl, *Astrocytes are active players in cerebral innate immunity.* Trends Immunol, 2007. **28**(3): p. 138-45.
30. Pfrieger, F.W. and B.A. Barres, *Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro.* Science, 1997. **277**(5332): p. 1684-7.
31. McGeer, P.L. and E.G. McGeer, *Glial reactions in Parkinson's disease.* Mov Disord, 2008. **23**(4): p. 474-83.
32. Damier, P., et al., *Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease.* Neuroscience, 1993. **52**(1): p. 1-6.
33. Lin, L.F., et al., *GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons.* Science, 1993. **260**(5111): p. 1130-2.
34. Hyman, C., et al., *BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra.* Nature, 1991. **350**(6315): p. 230-2.
35. McTigue, D.M. and R.B. Tripathi, *The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS.* J Neurochem, 2008. **107**(1): p. 1-19.

36. Compston, A., et al., *Glial lineages and myelination in the central nervous system*. J Anat, 1997. **190** (Pt 2): p. 161-200.
37. Wilkin, G.P. and C. Knott, *Glia: a curtain raiser*. Adv Neurol, 1999. **80**: p. 3-7.
38. Giulian, D., et al., *Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte*. J Neurosci, 1995. **15**(11): p. 7712-26.
39. Soulet, D. and S. Rivest, *Microglia*. Curr Biol, 2008. **18**(12): p. R506-8.
40. Aschner, M. and L.G. Costa, *The role of glia in neurotoxicity*. 2nd ed. 2005, Boca Raton, FL: CRC Press. 456 p., [12] p. of plates.
41. del Rio-Hortega, P., *Microglia*. Cytology and cellular pathology of the nervous system, 1932: p. pp. 481-534.
42. Streit, W.J., *Microglia and macrophages in the developing CNS*. Neurotoxicology, 2001. **22**(5): p. 619-24.
43. Takahashi, K., F. Yamamura, and M. Naito, *Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study*. J Leukoc Biol, 1989. **45**(2): p. 87-96.
44. Alliot, F., I. Godin, and B. Pessac, *Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain*. Brain Res Dev Brain Res, 1999. **117**(2): p. 145-52.
45. Pessac, B., I. Godin, and F. Alliot, *[Microglia: origin and development]*. Bull Acad Natl Med, 2001. **185**(2): p. 337-46; discussion 346-7.

46. Kim, Y.S. and T.H. Joh, *Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease*. Exp Mol Med, 2006. **38**(4): p. 333-47.
47. Kaushal, V., *Microglia and neurotoxicity the role of potassium-calcium channels and development of a novel model of microglia activation*. 2009, Library and Archives Canada = Bibliothèque et Archives Canada: Ottawa.
48. Frade, J.M. and Y.A. Barde, *Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina*. Neuron, 1998. **20**(1): p. 35-41.
49. Sorokin, S.P., et al., *Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker*. Anat Rec, 1992. **232**(4): p. 527-50.
50. Sunderkotter, C., et al., *Macrophages and angiogenesis*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(3): p. 410-22.
51. Wood, P.L., *Neuroinflammation : mechanisms and management*. 2nd ed. Contemporary neuroscience. 2003, Totowa, N.J.: Humana Press. 419 p.
52. Davalos, D., et al., *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 752-8.
53. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. Science, 2005. **308**(5726): p. 1314-8.
54. Hoek, R.M., et al., *Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200)*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1768-71.

55. Neumann, H., *Control of glial immune function by neurons*. Glia, 2001. **36**(2): p. 191-9.
56. Neumann, H., et al., *Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5779-84.
57. Vincent, V.A., F.J. Tilders, and A.M. Van Dam, *Inhibition of endotoxin-induced nitric oxide synthase production in microglial cells by the presence of astroglial cells: a role for transforming growth factor beta*. Glia, 1997. **19**(3): p. 190-8.
58. Aloisi, F., *Immune function of microglia*. Glia, 2001. **36**(2): p. 165-79.
59. Phillips, L.M., P.J. Simon, and L.A. Lampson, *Site-specific immune regulation in the brain: differential modulation of major histocompatibility complex (MHC) proteins in brainstem vs. hippocampus*. J Comp Neurol, 1999. **405**(3): p. 322-33.
60. Kim, Y.S., et al., *Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia*. J Neurosci, 2005. **25**(14): p. 3701-11.
61. Wilms, H., et al., *Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease*. Faseb J, 2003. **17**(3): p. 500-2.
62. Langston, J.W., et al., *Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure*. Ann Neurol, 1999. **46**(4): p. 598-605.

63. Liou, H.H., et al., *Effects of paraquat on the substantia nigra of the wistar rats: neurochemical, histological, and behavioral studies*. Toxicol Appl Pharmacol, 1996. **137**(1): p. 34-41.
64. Castano, A., et al., *Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system*. J Neurochem, 1998. **70**(4): p. 1584-92.
65. Nguyen, M.D., J.P. Julien, and S. Rivest, *Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration?* Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(3): p. 216-27.
66. Burudi, E.M., et al., *Identification and functional characterization of the mannose receptor in astrocytes*. Glia, 1999. **25**(1): p. 44-55.
67. Nadeau, S. and S. Rivest, *Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia*. J Neurosci, 2000. **20**(9): p. 3456-68.
68. Alexander, J.J., et al., *The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation-neuro-protection and -degeneration*. J Neurochem, 2008. **107**(5): p. 1169-87.
69. Wright, S.D., et al., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
70. Takeda, K. and S. Akira, *Roles of Toll-like receptors in innate immune responses*. Genes Cells, 2001. **6**(9): p. 733-42.

71. McKimmie, C.S. and J.K. Fazakerley, *In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression.* J Neuroimmunol, 2005. **169**(1-2): p. 116-25.
72. Ulvestad, E., et al., *Fc receptors for IgG on cultured human microglia mediate cytotoxicity and phagocytosis of antibody-coated targets.* J Neuropathol Exp Neurol, 1994. **53**(1): p. 27-36.
73. Hunot, S., et al., *FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells.* J Neurosci, 1999. **19**(9): p. 3440-7.
74. Barnum, S.R., *Inhibition of complement as a therapeutic approach in inflammatory central nervous system (CNS) disease.* Mol Med, 1999. **5**(9): p. 569-82.
75. Webster, S.D., et al., *Structural and functional evidence for microglial expression of C1qR(P), the C1q receptor that enhances phagocytosis.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 109-16.
76. Vass, K. and H. Lassmann, *Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system.* Am J Pathol, 1990. **137**(4): p. 789-800.
77. Dopp, J.M., et al., *Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia.* J Neuroimmunol, 1997. **75**(1-2): p. 104-12.

78. Shan, S., et al., *NEW evidences for fractalkine/CX3CL1 involved in substantia nigral microglial activation and behavioral changes in a rat model of Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2009.
79. Stack, E. and R.N. DuBois, *Regulation of cyclo-oxygenase-2*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2001. **15**(5): p. 787-800.
80. Caggiano, A.O. and R.P. Kraig, *Prostaglandin E receptor subtypes in cultured rat microglia and their role in reducing lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta production*. J Neurochem, 1999. **72**(2): p. 565-75.
81. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 111-35.
82. Tan, J., et al., *Ligation of microglial CD40 results in p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF-alpha production that is opposed by TGF-beta 1 and IL-10*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6614-21.
83. Okuno, T., et al., *Loss of dopaminergic neurons by the induction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via CD 40: relevance to Parkinson's disease*. J Neurosci Res, 2005. **81**(6): p. 874-82.
84. Kreutzberg, G.W., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*. Trends Neurosci, 1996. **19**(8): p. 312-8.
85. Graeber, M.B., et al., *Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy*. Neurosci Lett, 1988. **85**(3): p. 317-21.
86. Pocock, J.M. and A.C. Liddle, *Microglial signalling cascades in neurodegenerative disease*. Prog Brain Res, 2001. **132**: p. 555-65.

87. Marchetti, B. and M.P. Abbracchio, *To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders?* Trends Pharmacol Sci, 2005. **26**(10): p. 517-25.
88. Hara, H., et al., *Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 2007-12.
89. Basu, A., et al., *The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury.* J Neurosci, 2002. **22**(14): p. 6071-82.
90. Sugama, S., et al., *Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18.* Neuroscience, 2007. **146**(3): p. 1388-99.
91. Juttler, E., V. Tarabin, and M. Schwaninger, *Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity.* Neuroscientist, 2002. **8**(3): p. 268-75.
92. Hofmann, K.W., et al., *Interleukin-6 serum levels in patients with Parkinson's disease.* Neurochem Res, 2009. **34**(8): p. 1401-4.
93. Hull, M., et al., *The participation of interleukin-6, a stress-inducible cytokine, in the pathogenesis of Alzheimer's disease.* Behav Brain Res, 1996. **78**(1): p. 37-41.
94. Reddy, J., et al., *IL-2-induced tumor necrosis factor (TNF)-beta expression: further analysis in the IL-2 knockout model, and comparison with TNF-alpha, lymphotoxin-beta, TNFR1 and TNFR2 modulation.* Int Immunol, 2001. **13**(2): p. 135-47.

95. Mogi, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients*. Neurosci Lett, 1994. **165**(1-2): p. 208-10.
96. Appel, K., P. Honegger, and P.J. Gebicke-Haerter, *Expression of interleukin-3 and tumor necrosis factor-beta mRNAs in cultured microglia*. J Neuroimmunol, 1995. **60**(1-2): p. 83-91.
97. Kawanokuchi, J., et al., *Production of interferon-gamma by microglia*. Mult Scler, 2006. **12**(5): p. 558-64.
98. Thery, C., et al., *Expression of macrophage colony-stimulating factor gene in the mouse brain during development*. J Neurosci Res, 1990. **26**(1): p. 129-33.
99. Lee, S.C., et al., *GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures*. Glia, 1994. **12**(4): p. 309-18.
100. Ringheim, G.E., *Mitogenic effects of interleukin-5 on microglia*. Neurosci Lett, 1995. **201**(2): p. 131-4.
101. Shin, W.H., et al., *Microglia expressing interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival in vivo*. Glia, 2004. **46**(2): p. 142-52.
102. Yang, M.S., et al., *Interleukin-13 and -4 induce death of activated microglia*. Glia, 2002. **38**(4): p. 273-80.
103. Frei, K., H. Lins, and A. Fontana, *Production and function of IL-10 in the central nervous system*. Schweiz Arch Neurol Psychiatr, 1994. **145**(3): p. 30-1.

104. Shimojo, M., et al., *Interleukin-2 enhances the viability of primary cultured rat neocortical neurons*. Neurosci Lett, 1993. **151**(2): p. 170-3.
105. Miwa, T., et al., *Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia*. J Neurosci Res, 1997. **50**(6): p. 1023-9.
106. Elkabes, S., L. Peng, and I.B. Black, *Lipopolysaccharide differentially regulates microglial trk receptor and neurotrophin expression*. J Neurosci Res, 1998. **54**(1): p. 117-22.
107. Block, M.L. and J.S. Hong, *Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism*. Prog Neurobiol, 2005. **76**(2): p. 77-98.
108. Twig, G., et al., *Real-time detection of reactive oxygen intermediates from single microglial cells*. Biol Bull, 2001. **201**(2): p. 261-2.
109. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
110. Ransohoff, R.M. and E.N. Benveniste, *Cytokines and the CNS*. 2nd ed. 2006, Boca Raton, FL: Taylor and Francis. 361 p., [4] p. of plates.
111. Mogi, M., et al., *Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients*. Neurosci Lett, 1994. **180**(2): p. 147-50.

112. Allan, S.M. and N.J. Rothwell, *Cytokines and acute neurodegeneration*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(10): p. 734-44.
113. Downen, M., et al., *Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture: role of tumor necrosis factor-alpha*. Glia, 1999. **28**(2): p. 114-27.
114. Maimone, D., et al., *Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 1991. **32**(1): p. 67-74.
115. Brodacki, B., et al., *Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism*. Neurosci Lett, 2008. **441**(2): p. 158-62.
116. Campbell, I.L., et al., *Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10061-5.
117. Sawada, M., et al., *Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia*. J Neurochem, 1999. **72**(4): p. 1466-71.
118. Wei, R. and G.M. Jonakait, *Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia*. J Neuroimmunol, 1999. **95**(1-2): p. 8-18.
119. van Boxel-Dezaire, A.H., et al., *Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 1999. **45**(6): p. 695-703.

120. Korner, H. and J.D. Sedgwick, *Tumour necrosis factor and lymphotoxin: molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity*. Immunol Cell Biol, 1996. **74**(5): p. 465-72.
121. Gommerman, J.L., et al., *A role for surface lymphotoxin in experimental autoimmune encephalomyelitis independent of LIGHT*. J Clin Invest, 2003. **112**(5): p. 755-67.
122. Barone, F.C., et al., *Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury*. Stroke, 1997. **28**(6): p. 1233-44.
123. Mayne, M., et al., *Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor-alpha expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage*. Stroke, 2001. **32**(1): p. 240-8.
124. Meda, L., et al., *Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma*. Nature, 1995. **374**(6523): p. 647-50.
125. McLaurin, J., et al., *Effect of tumor necrosis factor alpha and beta on human oligodendrocytes and neurons in culture*. Int J Dev Neurosci, 1995. **13**(3-4): p. 369-81.
126. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 675-705.
127. Minghetti, L., *Role of inflammation in neurodegenerative diseases*. Curr Opin Neurol, 2005. **18**(3): p. 315-21.

128. Girard, S., et al., *Lipopolysaccharide and hypoxia/ischemia induced IL-2 expression by microglia in neonatal brain*. Neuroreport, 2008. **19**(10): p. 997-1002.
129. Lee, Y.B., et al., *Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture*. Neuroreport, 1996. **7**(5): p. 1062-6.
130. Meuer, K., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor is neuroprotective in a model of Parkinson's disease*. J Neurochem, 2006. **97**(3): p. 675-86.
131. Barnham, K.J., C.L. Masters, and A.I. Bush, *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(3): p. 205-14.
132. Emerit, J., M. Edeas, and F. Bricaire, *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Biomed Pharmacother, 2004. **58**(1): p. 39-46.
133. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. **443**(7113): p. 787-95.
134. Favier, A., *[Oxidative stress in human diseases]*. Ann Pharm Fr, 2006. **64**(6): p. 390-6.
135. Kohchi, C., et al., *ROS and innate immunity*. Anticancer Res, 2009. **29**(3): p. 817-21.
136. Murphy, S., et al., *Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells*. Trends Neurosci, 1993. **16**(8): p. 323-8.
137. Corradin, S.B., et al., *Inducible nitric oxide synthase activity of cloned murine microglial cells*. Glia, 1993. **7**(3): p. 255-62.

138. Dawson, V.L., et al., *Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures*. J Neurosci, 1993. **13**(6): p. 2651-61.
139. Bolanos, J.P., et al., *Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases*. J Neurochem, 1997. **68**(6): p. 2227-40.
140. Iadecola, C., et al., *Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene*. J Neurosci, 1997. **17**(23): p. 9157-64.
141. Liberatore, G.T., et al., *Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1403-9.
142. Fernandez-Vizarra, P., et al., *Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis, 2004. **15**(2): p. 287-305.
143. Lipton, S.A., et al., *A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds*. Nature, 1993. **364**(6438): p. 626-32.
144. O'Banion, M.K., *COX-2 and Alzheimer's disease: potential roles in inflammation and neurodegeneration*. Expert Opin Investig Drugs, 1999. **8**(10): p. 1521-1536.
145. Hunot, S., et al., *JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(2): p. 665-70.

146. Teismann, P., et al., *Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2003. **18**(2): p. 121-9.
147. Srebro, Z. and K. Dziobek, *Neuroprotection: the role of neuroglia*. Folia Med Cracov, 2001. **42**(3): p. 113-21.
148. Manyam, B.V., *Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise*. Mov Disord, 1990. **5**(1): p. 47-8.
149. Katzenschlager, R., et al., *Mucuna pruriens in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004. **75**(12): p. 1672-7.
150. Calne, D.B., A. Dubini, and G. Stern, *Did Leonardo describe Parkinson's disease?* N Engl J Med, 1989. **320**(9): p. 594.
151. Parkinson, J., *An essay on the shaking palsy*. 1817. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2002. **14**(2): p. 223-36; discussion 222.
152. Charcot, A.V.a.J.-M., *De la paralysie agitante*. Gaz Hebdomadaire Med. Chir., 1861. **8**: p. 765-767.
153. Hauser, R.A., *Levodopa: Past, Present, and Future*. Eur Neurol, 2008. **62**(1): p. 1-8.
154. Myers, R.L., *The 100 most important chemical compounds : a reference guide*, ed. C. Westport. 2007: GreenWood Press.
155. Carlsson, A. and B. Waldeck, *A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine)*. Acta Physiol Scand, 1958. **44**(3-4): p. 293-8.

156. Tanner, C.M. and D.A. Aston, *Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes*. Curr Opin Neurol, 2000. **13**(4): p. 427-30.
157. Mathers, C., et al., *The global burden of disease : 2004 update*. 2008, Geneva, Switzerland: World Health Organization. vii, 146 p.
158. Kontakos, N. and J. Stokes, *Monograph series on aging-related diseases: XII. Parkinson's disease--recent developments and new directions*. Chronic Dis Can, 1999. **20**(2): p. 58-76.
159. Van Den Eeden, S.K., et al., *Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity*. Am J Epidemiol, 2003. **157**(11): p. 1015-22.
160. Alves, G., et al., *Epidemiology of Parkinson's disease*. J Neurol, 2008. **255** Suppl 5: p. 18-32.
161. Elbaz, A., et al., *Survival study of Parkinson disease in Olmsted County, Minnesota*. Arch Neurol, 2003. **60**(1): p. 91-6.
162. Pollak, P., *La maladie de Parkinson. santé au quotidien*, ed. O. Jacob. 2004, Paris. 191.
163. Hughes, A.J., S.E. Daniel, and A.J. Lees, *The clinical features of Parkinson's disease in 100 histologically proven cases*. Adv Neurol, 1993. **60**: p. 595-9.
164. Trail, M., E. Protas, and E.C. Lai, *Neurorehabilitation in Parkinson's disease : an evidence-based treatment model*. 2008, Thorofare, NJ: SLACK Inc. xiv, 361 p.

165. Dauer, W. and S. Przedborski, *Parkinson's disease: mechanisms and models*. Neuron, 2003. **39**(6): p. 889-909.
166. Dujardin, K., *Neuropsychologie de la maladie de Parkinson et des syndromes apparentés*. 2e éd. ed. 2007, Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson. viii, 169 p.
167. Rouhart, F.Z.a.F., *Maladie de Parkinson*. 2e ed, ed. c. conduites. 2006: Doin. 218.
168. Gowers, W.R., *A Manual of Diseases of the Nervous System*. 2nd ed. Vol. II. 1893, Blakiston. 644.
169. Chaudhuri, K.R. and Y. Naidu, *Early Parkinson's disease and non-motor issues*. J Neurol, 2008. **255 Suppl 5**: p. 33-8.
170. Lieberman, A., *Depression in Parkinson's disease -- a review*. Acta Neurol Scand, 2006. **113**(1): p. 1-8.
171. Richard, I.H., R.B. Schiffer, and R. Kurlan, *Anxiety and Parkinson's disease*. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 1996. **8**(4): p. 383-92.
172. Emre, M., *Dementia in Parkinson's disease: cause and treatment*. Curr Opin Neurol, 2004. **17**(4): p. 399-404.
173. Waseem, S. and K. Gwinn-Hardy, *Pain in Parkinson's disease. Common yet seldom recognized symptom is treatable*. Postgrad Med, 2001. **110**(6): p. 33-4, 39-40, 46.

174. Muller, A., et al., *Olfactory function in idiopathic Parkinson's disease (IPD): results from cross-sectional studies in IPD patients and long-term follow-up of de-novo IPD patients*. J Neural Transm, 2002. **109**(5-6): p. 805-11.
175. Kumar, S., M. Bhatia, and M. Behari, *Sleep disorders in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2002. **17**(4): p. 775-81.
176. Pfeiffer, R.F., *Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2003. **2**(2): p. 107-16.
177. Fischer, M., et al., *Skin function and skin disorders in Parkinson's disease*. J Neural Transm, 2001. **108**(2): p. 205-13.
178. Molina, J.A., et al., *Pathologic gambling in Parkinson's disease: a behavioral manifestation of pharmacologic treatment?* Mov Disord, 2000. **15**(5): p. 869-72.
179. de Rijk, M.C., et al., *A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease*. Neurology, 1997. **48**(5): p. 1277-81.
180. Fischman, A.J., *Role of [18F]-dopa-PET imaging in assessing movement disorders*. Radiol Clin North Am, 2005. **43**(1): p. 93-106.
181. Wang, J., et al., *99mTc-TRODAT-1 SPECT study in early Parkinson's disease and essential tremor*. Acta Neurol Scand, 2005. **112**(6): p. 380-5.
182. Lees, A.J., J. Hardy, and T. Revesz, *Parkinson's disease*. Lancet, 2009. **373**(9680): p. 2055-66.
183. Youdim, M.B. and P. Riederer, *Understanding Parkinson's disease*. Sci Am, 1997. **276**(1): p. 52-9.

184. Marsden, C.D., *Neuromelanin and Parkinson's disease*. J Neural Transm Suppl, 1983. **19**: p. 121-41.
185. German, D.C., et al., *Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease: computer visualization*. Ann Neurol, 1989. **26**(4): p. 507-14.
186. Graybiel, A.M., E.C. Hirsch, and Y. Agid, *The nigrostriatal system in Parkinson's disease*. Adv Neurol, 1990. **53**: p. 17-29.
187. Triarhou, L.C., *Introduction. Dopamine and Parkinson's disease*. Adv Exp Med Biol, 2002. **517**: p. 1-14.
188. Lewy, F., *Paralysis Agitans Part I : Pathologische Anatomie*. Lewandowsky M (ed) Handbuch der Neurologie, 1912. **III**: p. 920-933.
189. Spillantini, M.G., et al., *alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6469-73.
190. Gibb, W.R. and A.J. Lees, *The significance of the Lewy body in the diagnosis of idiopathic Parkinson's disease*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1989. **15**(1): p. 27-44.
191. Tanner, C.M., et al., *Parkinson disease in twins: an etiologic study*. Jama, 1999. **281**(4): p. 341-6.
192. Polymeropoulos, M.H., et al., *Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23*. Science, 1996. **274**(5290): p. 1197-9.

193. Devine, M.J. and P.A. Lewis, *Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: tangles, Lewy bodies and LRRK2*. Febs J, 2008. **275**(23): p. 5748-57.
194. Conway, K.A., J.D. Harper, and P.T. Lansbury, *Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1318-20.
195. Forloni, G., et al., *Alpha-synuclein and Parkinson's disease: selective neurodegenerative effect of alpha-synuclein fragment on dopaminergic neurons in vitro and in vivo*. Ann Neurol, 2000. **47**(5): p. 632-40.
196. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 605-8.
197. Leroy, E., et al., *The ubiquitin pathway in Parkinson's disease*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 451-2.
198. Liu, Z., et al., *Membrane-associated farnesylated UCH-L1 promotes alpha-synuclein neurotoxicity and is a therapeutic target for Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4635-40.
199. Heutink, P., *PINK-1 and DJ-1--new genes for autosomal recessive Parkinson's disease*. J Neural Transm Suppl, 2006(70): p. 215-9.
200. Bonifati, V., et al., *DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism*. Neurol Sci, 2003. **24**(3): p. 159-60.
201. Martinat, C., et al., *Sensitivity to oxidative stress in DJ-1-deficient dopamine neurons: an ES- derived cell model of primary Parkinsonism*. PLoS Biol, 2004. **2**(11): p. e327.

202. Funayama, M., et al., *A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1*. Ann Neurol, 2002. **51**(3): p. 296-301.
203. Paisan-Ruiz, C., et al., *Comprehensive analysis of LRRK2 in publicly available Parkinson's disease cases and neurologically normal controls*. Hum Mutat, 2008. **29**(4): p. 485-90.
204. Rybicki, B.A., et al., *Parkinson's disease mortality and the industrial use of heavy metals in Michigan*. Mov Disord, 1993. **8**(1): p. 87-92.
205. Seidler, A., et al., *Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany*. Neurology, 1996. **46**(5): p. 1275-84.
206. Gorell, J.M., et al., *Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease*. Neurology, 1997. **48**(3): p. 650-8.
207. Langston, J.W., et al., *Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis*. Science, 1983. **219**(4587): p. 979-80.
208. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol, 1997. **82**(2): p. 291-5.
209. Lotharius, J. and P. Brundin, *Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(12): p. 932-42.
210. Miller, R.L., et al., *Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease*. Neurochem Res, 2009. **34**(1): p. 55-65.

- 211. Cohen, G., *Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons*. Neurotoxicology, 1984. **5**(1): p. 77-82.
- 212. Jenner, P., *Oxidative stress in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S26-36; discussion S36-8.
- 213. Smith, P.F., *Inflammation in Parkinson's disease: an update*. Curr Opin Investig Drugs, 2008. **9**(5): p. 478-84.
- 214. Hunot, S. and E.C. Hirsch, *Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S49-58; discussion S58-60.
- 215. Sierra, A., et al., *Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile*. Glia, 2007. **55**(4): p. 412-24.
- 216. Godbout, J.P., et al., *Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system*. Faseb J, 2005. **19**(10): p. 1329-31.
- 217. Gayle, D.A., et al., *Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide*. Brain Res Dev Brain Res, 2002. **133**(1): p. 27-35.
- 218. Arimoto, T. and G. Bing, *Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration*. Neurobiol Dis, 2003. **12**(1): p. 35-45.
- 219. Chen, H., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease*. Arch Neurol, 2003. **60**(8): p. 1059-64.

- 220. Aubin, N., et al., *Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice*. J Neurochem, 1998. **71**(4): p. 1635-42.
- 221. Ferger, B., et al., *Salicylate protects against MPTP-induced impairments in dopaminergic neurotransmission at the striatal and nigral level in mice*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999. **360**(3): p. 256-61.
- 222. Carrasco, E., D. Casper, and P. Werner, *Dopaminergic neurotoxicity by 6-OHDA and MPP⁺: differential requirement for neuronal cyclooxygenase activity*. J Neurosci Res, 2005. **81**(1): p. 121-31.
- 223. Wu, D.C., et al., *Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease*. J Neurosci, 2002. **22**(5): p. 1763-71.
- 224. He, Y., S. Appel, and W. Le, *Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum*. Brain Res, 2001. **909**(1-2): p. 187-93.
- 225. Markey, S.P., et al., *Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism*. Nature, 1984. **311**(5985): p. 464-7.
- 226. Vila, M. and S. Przedborski, *Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(5): p. 365-75.
- 227. Klaidman, L.K., et al., *Redox cycling of MPP⁺: evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipamide dehydrogenase*. Free Radic Biol Med, 1993. **15**(2): p. 169-79.

228. Ramsay, R.R., et al., *The inhibition site of MPP⁺, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase*. Arch Biochem Biophys, 1987. **259**(2): p. 645-9.
229. Beal, M.F., *Experimental models of Parkinson's disease*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(5): p. 325-34.
230. Barcia, C., et al., *Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure*. Glia, 2004. **46**(4): p. 402-9.
231. Gao, H.M., et al., *Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease*. Faseb J, 2003. **17**(13): p. 1954-6.
232. Wesseling, C., et al., *Paraquat in developing countries*. Int J Occup Environ Health, 2001. **7**(4): p. 275-86.
233. McCormack, A.L. and D.A. Di Monte, *Effects of L-dopa and other amino acids against paraquat-induced nigrostriatal degeneration*. J Neurochem, 2003. **85**(1): p. 82-6.
234. Bus, J.S. and J.E. Gibson, *Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity*. Environ Health Perspect, 1984. **55**: p. 37-46.
235. Mollace, V., et al., *The role of oxidative stress in paraquat-induced neurotoxicity in rats: protection by non peptidyl superoxide dismutase mimetic*. Neurosci Lett, 2003. **335**(3): p. 163-6.

236. Liou, H.H., et al., *Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan*. Neurology, 1997. **48**(6): p. 1583-8.
237. Gorell, J.M., et al., *The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living*. Neurology, 1998. **50**(5): p. 1346-50.
238. McCormack, A.L., et al., *Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat*. Neurobiol Dis, 2002. **10**(2): p. 119-27.
239. Grant, H., P.L. Lantos, and C. Parkinson, *Cerebral damage in paraquat poisoning*. Histopathology, 1980. **4**(2): p. 185-95.
240. Wu, X.F., et al., *The role of microglia in paraquat-induced dopaminergic neurotoxicity*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(5-6): p. 654-61.
241. Dutta, G., P. Zhang, and B. Liu, *The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery*. Fundam Clin Pharmacol, 2008. **22**(5): p. 453-64.
242. da Silva Correia, J., et al., *Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21129-35.
243. Hailman, E., et al., *Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 269-77.
244. Gao, H.M., et al., *Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease*. J Neurochem, 2002. **81**(6): p. 1285-97.

245. Kim, W.G., et al., *Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia*. J Neurosci, 2000. **20**(16): p. 6309-16.
246. Bronstein, D.M., et al., *Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures*. Brain Res, 1995. **704**(1): p. 112-6.
247. Arai, H., et al., *Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1beta, and expression of caspase-11 in mice*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 51647-53.
248. Sawada, M., et al., *Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture*. Brain Res, 1989. **491**(2): p. 394-7.
249. Lee, S.C., et al., *Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta*. J Immunol, 1993. **150**(7): p. 2659-67.
250. Zielasek, J., et al., *Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages*. Cell Immunol, 1992. **141**(1): p. 111-20.
251. Benabid, A.L., et al., *Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease*. Appl Neurophysiol, 1987. **50**(1-6): p. 344-6.
252. Boots, A.W., G.R. Haenen, and A. Bast, *Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical*. Eur J Pharmacol, 2008. **585**(2-3): p. 325-37.

253. Yance, D.R. and A. Valentine, *Herbal medicine, healing & cancer : a comprehensive program for prevention and treatment*. 1999, Los Angeles, Calif.: Keats Publishing. xxii, 456 p.
254. Avila, M.A., et al., *Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468*. *Cancer Res*, 1994. **54**(9): p. 2424-8.
255. Gulati, N., et al., *The antiproliferative effect of Quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway*. *Anticancer Res*, 2006. **26**(2A): p. 1177-81.
256. Hirvonen, T., et al., *Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland)*. *Cancer Causes Control*, 2001. **12**(9): p. 789-96.
257. Knekt, P., et al., *Flavonoid intake and risk of chronic diseases*. *Am J Clin Nutr*, 2002. **76**(3): p. 560-8.
258. Kuo, S.M., *Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells*. *Cancer Lett*, 1996. **110**(1-2): p. 41-8.
259. Moon, H., et al., *Quercetin inhalation inhibits the asthmatic responses by exposure to aerosolized-ovalbumin in conscious guinea-pigs*. *Arch Pharm Res*, 2008. **31**(6): p. 771-8.
260. Otsuka, H., et al., *Histochemical and functional characteristics of metachromatic cells in the nasal epithelium in allergic rhinitis: studies of nasal scrapings and their dispersed cells*. *J Allergy Clin Immunol*, 1995. **96**(4): p. 528-36.
261. Arts, M.J.T.J., et al., *A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay*. *Food Chemistry*, 2004. **88**(4): p. 567-570.

262. Heijnen, C.G., et al., *Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups*. Toxicol In Vitro, 2001. **15**(1): p. 3-6.
263. Heo, H.J. and C.Y. Lee, *Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(25): p. 7514-7.
264. Wilms, L.C., et al., *Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes*. Mutat Res, 2005. **582**(1-2): p. 155-62.
265. Bureau, G., F. Longpre, and M.G. Martinoli, *Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation*. J Neurosci Res, 2008. **86**(2): p. 403-10.
266. Chen, J.C., et al., *Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of IkappaB kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia*. Eur J Pharmacol, 2005. **521**(1-3): p. 9-20.
267. Katske, F., et al., *Treatment of interstitial cystitis with a quercetin supplement*. Tech Urol, 2001. **7**(1): p. 44-6.
268. Manjeet, K.R. and B. Ghosh, *Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-[alpha] production in murine macrophages*. International Journal of Immunopharmacology, 1999. **21**(7): p. 435-443.
269. Min, Y.D., et al., *Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line*. Inflamm Res, 2007. **56**(5): p. 210-5.

270. Nair, M.P., et al., *The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappa beta system*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(3): p. 319-28.
271. Peet, G.W. and J. Li, *IkappaB kinases alpha and beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32655-61.
272. Rao, Y.K., S.H. Fang, and Y.M. Tzeng, *Inhibitory effects of the flavonoids isolated from Waltheria indica on the production of NO, TNF-alpha and IL-12 in activated macrophages*. Biol Pharm Bull, 2005. **28**(5): p. 912-5.
273. Shoskes, D.A., et al., *Quercetin in men with category III chronic prostatitis: a preliminary prospective, double-blind, placebo-controlled trial*. Urology, 1999. **54**(6): p. 960-3.
274. *Toxicology and Carcinogenesis Studies of Quercetin (CAS No. 117-39-5) in F344 Rats (Feed Studies)*. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 1992. **409**: p. 1-171.
275. Egert, S., et al., *Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans*. J Nutr, 2008. **138**(9): p. 1615-21.
276. D'Archivio, M., et al., *Polyphenols, dietary sources and bioavailability*. Ann Ist Super Sanita, 2007. **43**(4): p. 348-61.
277. Hollman, P.C., et al., *Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man*. Cancer Lett, 1997. **114**(1-2): p. 139-40.

278. Ranelletti, F., O. , et al., *Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors*. 2000. p. 438-445.
279. Park, H.H., et al., *Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells*. Arch Pharm Res, 2008. **31**(10): p. 1303-11.
280. Namiki, M., *Nutraceutical functions of sesame: a review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2007. **47**(7): p. 651-73.
281. Miyawaki, T., et al., *Antihypertensive effects of sesamin in humans*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2009. **55**(1): p. 87-91.
282. Noguchi, T., et al., *Effects of vitamin E and sesamin on hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004. **31 Suppl 2**: p. S24-6.
283. Sankar, D., *Impact of sesame oil on nifedipine in modulating oxidative stress and electrolytes in hypertensive patients*. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 2004. **13(suppl)** p. S107.
284. Hirata, F., et al., *Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans*. Atherosclerosis, 1996. **122**(1): p. 135-36.
285. Hirose, N., et al., *Inhibition of cholesterol absorption and synthesis in rats by sesamin*. J Lipid Res, 1991. **32**(4): p. 629-38.
286. Tsuruoka, N., et al., *Modulating effect of sesamin, a functional lignan in sesame seeds, on the transcription levels of lipid- and alcohol-metabolizing enzymes in*

- rat liver: a DNA microarray study*. Biosci Biotechnol Biochem, 2005. **69**(1): p. 179-88.
287. Suja, K.P., A. Jayalekshmy, and C. Arumughan, *Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (sesamum indicum L.) in DPPH(*) system*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(4): p. 912-5.
 288. Hemalatha, S., M. Raghunath, and Ghafoorunissa, *Dietary sesame oils inhibits iron-induced oxidative stress in rats [corrected]*. Br J Nutr, 2004. **92**(4): p. 581-7.
 289. Hou, R.C., et al., *Protective effects of sesamin and sesamolin on hypoxic neuronal and PC12 cells*. J Neurosci Res, 2003. **74**(1): p. 123-33.
 290. Kang, M.H., et al., *Dietary defatted sesame flour decreases susceptibility to oxidative stress in hypercholesterolemic rabbits*. J Nutr, 1999. **129**(10): p. 1885-90.
 291. Fujikawa, T., et al., *Effect of sesamin in Acanthopanax senticosus HARMS on behavioral dysfunction in rotenone-induced parkinsonian rats*. Biol Pharm Bull, 2005. **28**(1): p. 169-72.
 292. Chavali, S.R., T. Utsunomiya, and R.A. Forse, *Increased survival after cecal ligation and puncture in mice consuming diets enriched with sesame seed oil*. Crit Care Med, 2001. **29**(1): p. 140-3.
 293. Han, A.R., et al., *Constituents of Asarum sieboldii with inhibitory activity on lipopolysaccharide (LPS)-induced NO production in BV-2 microglial cells*. Chem Biodivers, 2008. **5**(2): p. 346-51.

294. Jeng, K.C., et al., *Sesamin inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production by suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB*. Immunol Lett, 2005. **97**(1): p. 101-6.
295. Gu, J.Y., et al., *Effects of sesamin and alpha-tocopherol, individually or in combination, on the polyunsaturated fatty acid metabolism, chemical mediator production, and immunoglobulin levels in Sprague-Dawley rats*. Biosci Biotechnol Biochem, 1995. **59**(12): p. 2198-202.
296. Saab, B.R., et al., *Sesame oil use in ameliorating cough in children: a randomised controlled trial*. Complement Ther Med, 2006. **14**(2): p. 92-9.
297. Utsunomiya, T., et al., *Effects of sesamin-supplemented dietary fat emulsions on the ex vivo production of lipopolysaccharide-induced prostanoids and tumor necrosis factor alpha in rats*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(3): p. 804-8.
298. Budowski, P., *Recent Research on Sesamin, Sesamolin, and related compounds*. The Journal of the American Oil Chemist' Society, 1964. **41**: p. 280-285.
299. Tashiro, T., et al., *Oil and minor components of sesame (Sesamum indicum L.) strains*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1990. **67**(8): p. 508-511.
300. Heinonen, S., et al., *In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(7): p. 3178-86.
301. Umeda-Sawada, R., M. Ogawa, and O. Igarashi, *The metabolism and distribution of sesame lignans (sesamin and episesamin) in rats*. Lipids, 1999. **34**(6): p. 633-7.

302. Budowski, P. and K.S. Markley, *The Chemical and Physiological Properties of Sesame Oil*. Chemical Reviews, 1951. **48**(1): p. 125-151.
303. Abe, C., S. Ikeda, and K. Yamashita, *Dietary sesame seeds elevate alpha-tocopherol concentration in rat brain*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2005. **51**(4): p. 223-30.
304. Gelinas, S. and M.G. Martinoli, *Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP+-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells*. J Neurosci Res, 2002. **70**(1): p. 90-6.
305. Lahaie-Collins, J.B., Marilyn Plouffe, Julie Carange and Maria-Grazia Martinoli, *Sesamin modulates tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase, catalase, inducible NO synthase and interleukin-6 expression in dopaminergic cells under MPP+-induced oxidative stress*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2008. **1**(1): p. 53-61.
306. Decker, T. and M.L. Lohmann-Matthes, *A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity*. J Immunol Methods, 1988. **115**(1): p. 61-9.
307. Martin, A. and M. Clynes, *Acid phosphatase: endpoint for in vitro toxicity tests*. In Vitro Cell Dev Biol, 1991. **27A**(3 Pt 1): p. 183-4.
308. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**: p. e45.

309. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**: p. RESEARCH0034.
310. Tatton, W.G., et al., *Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S61-70; discussion S70-2.
311. Whitton, P.S., *Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease*. Br J Pharmacol, 2007. **150**(8): p. 963-76.
312. Chen, H., et al., *Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2005. **58**(6): p. 963-7.
313. Streit, W.J., *Microglial response to brain injury: a brief synopsis*. Toxicol Pathol, 2000. **28**(1): p. 28-30.
314. Hunter, R.L., et al., *Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system*. J Neurochem, 2007. **100**(5): p. 1375-86.
315. Liu, B. and J.S. Hong, *Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **304**(1): p. 1-7.
316. Jenner, P., *Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease*. Mov Disord, 1998. **13 Suppl 1**: p. 24-34.
317. Greenamyre, J.T., et al., *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Biochem Soc Symp, 1999. **66**: p. 85-97.

- 318. McGeer, E.G., A. Klegeris, and P.L. McGeer, *Inflammation, the complement system and the diseases of aging*. Neurobiol Aging, 2005. **26 Suppl 1**: p. 94-7.
- 319. Tansey, M.G., et al., *Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy?* Front Biosci, 2008. **13**: p. 709-17.
- 320. Zhao, B., *Nitric oxide in neurodegenerative diseases*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 454-61.
- 321. McGeer, P.L. and E.G. McGeer, *Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2004. **10 Suppl 1**: p. S3-7.
- 322. Du, Y., et al., *Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14669-74.
- 323. Zheng, L.T., et al., *Suppressive effects of flavonoid fisetin on lipopolysaccharide-induced microglial activation and neurotoxicity*. Int Immunopharmacol, 2008. **8**(3): p. 484-94.
- 324. Miller, R.L., G.Y. Sun, and A.Y. Sun, *Cytotoxicity of paraquat in microglial cells: Involvement of PKCdelta- and ERK1/2-dependent NADPH oxidase*. Brain Res, 2007. **1167**: p. 129-39.